



TCBS KOBAYASHI AGAR

Flaconi pronti per l'uso



TCBS Kobayashi Agar
colonie di *Vibrio parahaemolyticus*

DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo pronto all'uso in piastra per l'isolamento di *Vibrio* spp. da campioni clinici quali le feci e da altri materiali non di origine clinica, quali i campioni ambientali e gli alimenti.

FORMULA TIPICA*

Peptone	10,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Sodio tiosolfato	10,00 g
Sodio citrato	10,00 g
Sodio cloruro	10,00 g
Bile di bue	8,00 g
Saccarosio	20,00 g
Ferro III citrato	1,00 g
Blu timolo	0,04 g
Blu bromotimolo	0,04 g
Agar	16,00 g
Acqua purificata	1000 ml

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

PREPARAZIONE DEL TERRENO

In un bagnomaria termoregolato a 100°C introdurre i flaconi e riscaldare fino a scioglimento completo. Raffreddare a 45-50°C mescolare e distribuire in piastra.

DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose) Kobayashi Agar, preparato in accordo alla formula di Nakanishi, modificata da Kobayashi e coll., è un terreno selettivo indicato per l'isolamento ed il conteggio dei microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* da campioni di origine clinica, da campioni ambientali e dagli alimenti.

Il terreno è consigliato dalle norme ISO e dal FDA-BAM per l'isolamento di *Vibrio parahaemolyticus* e di *Vibrio cholerae* e da ISO 21872 per la determinazione di *Vibrio* spp. nei campioni della catena alimentare.

Il terreno contiene due indicatori di pH, il blu timolo ed il blu bromotimolo: la fermentazione del saccarosio induce acidificazione ed il conseguente viraggio al giallo del terreno. Inoltre contiene un sistema indicatore della formazione di idrogeno solforato costituito dal sodio tiosolfato e dal ferro II citrato. Gli inibitori della flora saprofitica sono i sali biliari, il sodio tiosolfato, il sodio citrato ed il pH alcalino.

TCBS Kobayashi Agar inibisce la crescita della maggior parte dei microrganismi fatta eccezione per gli alofili. Gli enterobatteri non coltivano su TCBS Agar; le rare colonie di alcuni ceppi di *Proteus* e di enterococchi sono facilmente distinguibili per le ridotte dimensioni e per essere prive di colorazione o provviste di centro nero.

Vibrio cholerae dopo 18-24 ore di incubazione, cresce su TCBS Kobayashi Agar formando colonie gialle (fermentazione del saccarosio). *Vibrio parahaemolyticus* non fermenta il saccarosio e coltiva su TCBS Agar con colonie blu-verdi. *Vibrio alginolyticus* fermenta il saccarosio e coltiva con colonie gialle. Tutte le colonie di *Vibrio* spp. sono H₂S negative.

CARATTERISTICHE DEL TERRENO IN PIASTRA

Aspetto: terreno limpido, verde scuro
pH finale a 25 °C: 8,6 ± 0,2

MATERIALI FORNITI

Flaconi pronti all'uso di TCBS Kobayashi Agar.

MATERIALI NON FORNITI

Bagnomaria, piastre petri, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori, termostato e strumentazione di laboratorio.

CAMPIONI

Il terreno può essere seminato direttamente con le feci tal quali, o con feci raccolte su tampone e conservate in terreno semisolido di trasporto (Farmer e coll. consigliano il terreno Cary-Blair). Il terreno può essere seminato anche con il materiale da conato di vomito e con campioni clinici extra-intestinali se si sospetta la presenza di *Vibrio* spp. Se si ritiene che il campione contenga una bassa carica di *Vibrio* spp. è consigliabile un passaggio in terreno liquido di arricchimento (Alkaline Peptone Water) e la semina di quest'ultimo su piastra di TCBS Agar.



Per i campioni non di origine clinica fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.

PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente. Lasciare asciugare la superficie del terreno in piastra ed inoculare pesantemente con il materiale fecale, strisciando con l'ansa per ottenere colonie isolate. Incubare a 37°C per 18-24 ore ed osservare per la presenza di colonie tipiche. Per il metodo d'impiego per campioni non clinici fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.

LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare ciascuna specifica caratteristica morfologica e cromatica delle colonie.

I diversi microrganismi coltivano su TCBS Kobayashi Agar con le seguenti caratteristiche:

Vibrio cholerae (fermentante il saccarosio): colonie bruno-giallastre circondate da una zona di colore giallo.

Vibrio parahaemolyticus (non fermentante il saccarosio): colonie più piccole incolori o verdi con centro blu-verde; il terreno non vira o vira leggermente al blu.

Vibrio alginolyticus (fermentante il saccarosio): larghe colonie giallastre circondate da una zona di colore giallo.

Altri batteri non fermentanti il saccarosio:

Vibrio vulnificus: colonie incolori o blu-verde.

Aeromonas e *Plesiomonas*: colonie blu-verde.

Enterobacteriaceae: colonie molto piccole, incolori, traslucide.

Enterococchi: colonie molto piccole con centro nero, circondate da un alone giallo.

Le crescite caratteristiche devono essere sottoposte a prove di conferma con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

CONTROLLO QUALITÀ

E' responsabilità dell'utilizzatore eseguire il controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO		INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	37°C / 24H / A	buona crescita, colonie verdi
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	37°C / 24H / A	crescita inibita
<i>E. faecalis</i>	ATCC 19433	37°C / 24H / A	crescita inibita

A: incubazione in aerobiosi

ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

LIMITI DEL METODO

- Rari ceppi di *V. cholerae* possono crescere con colonie verde-blu a causa di una ritardata fermentazione del saccarosio.
- *V. harveyi*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metschnikovii*, fermentano il saccarosio e coltivano con colonie simili a quelle di *V. cholerae*.
- Nell'isolamento primario dal campione, *Vibrio parahaemolyticus* può essere confuso *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* e *Pseudomonas* spp.
- I ceppi di *Proteus* spp. fermentanti il saccarosio possono produrre colonie molto simili a quelle di *Vibrio* spp. fermentanti il saccarosio.
- Per l'esecuzione del test dell'ossidasi e delle prove di agglutinazione è raccomandabile una subcoltura in Nutrient Agar o altro adatto terreno, poiché TCBS Agar è ritenuto inadatto all'esecuzione diretta di tali test.
- Coltivare i campioni extra-intestinali anche su un terreno al sangue non selettivo e su altre piastre selettive per individuare altri patogeni eventualmente coinvolti nell'infezione.
- Il terreno in piastra qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Il prodotto qui descritto contiene peptoni di origine animale. Scaricare da sito web www.biolifeitaliana.it il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alla TSE.
- Il terreno qui descritto è un diagnostico di tipo qualitativo per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I flaconi pronti all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggetti a sterilizzazione terminale ma un prodotto a biocontaminazione controllata e nei limiti di specifiche definite.
- Sterilizzare le piastre dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire i rifiuti in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare oltre la data di scadenza. Non utilizzare se vi sono segni evidenti di deterioramento.
- Scaricare i Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto dal sito www.biolifeitaliana.it



Biolife

Scheda tecnica - foglio istruzioni

N°ST-512106 rev.3.doc rev 3 02/2020 pag. 3 di 3

CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC (1995) - Official Method of Analysis, 16th Ed.
- Farmer III, J.J., J.M. Janda, and K. Birkhead. *Vibrio*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jørgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- FDA (1995) - Bacteriological Analytical Manual for Foods. 8th edition.
- ISO/TS 21872-1:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. -- Part 1: Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*
- ISO/TS 21872-2:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* spp. -- Part 2: Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakasaki, R. & Kuwahara S. (1963) - A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's Medium (TCBS Agar Medium). *Jap. J. Bacteriol.*, 18, 10-11; 392-397.
- Mac Faddin, J.F. (1985) *Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Nakanishi Y. (1963) – *Modern Media*, 9, 246

CONFEZIONI

5121062 TCBS KOBAYASHI AGAR, 6 flaconi da 100 ml

CODICE CND: W0104010405 – **CODICE RDM:** 1455635/R



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.