

TRYPTIC SOY BROTH MODIFIED (mTSB) NOVOBIOCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplemento, flaconi pronti all'uso

1 – DESTINAZIONE D'USO

Con l'aggiunta di novobiocina, il Tryptic Soy Broth Modified (mTSB) viene utilizzato per l'arricchimento selettivo di *Escherichia coli* O157 negli alimenti.

2 – COMPOSIZIONE

TRYPTIC SOY BROTH MODIFIED (mTSB), TERRENO IN POLVERE FORMULA TIPICA DOPO LA RICOSTITUZIONE CON 1 L DI ACQUA*

Digerito pancreatico di caseina	17,0 g
Peptone di soia	3,0 g
Closure di sodio	5,0 g
Idrogeno fosfato dipotassico	4,0 g
Glucosio	2,5 g
Sali biliari N° 3	1,5 g

NOVOBIOCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT – CONTENUTO PER FLACONE

Novobiocin	10 mg
------------	-------

FLACONI DI TSB MODIFICATO PRONTI PER L'USO – FORMULA TIPICA PER LITRO

Brodo di soia triptica modificato (mTSB)	33 g
Novobiocin	20 mg
Acqua	1000 mL

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

L'mTSB è stato ideato da Doyle e Shoeni¹ aumentando la concentrazione del tampone fosfato del Tryptic Soy Broth e aggiungendo sali biliari n° 3 e novobiocina, con l'obiettivo di sviluppare una procedura in grado di isolare specificamente *E. coli* O157:H7 dagli alimenti.

Il terreno è raccomandato dalla norma ISO 16654² per la preparazione della sospensione iniziale del campione e per la procedura di arricchimento per la rilevazione di *E. coli* O157 negli alimenti. Corrisponde al terreno n° 156 della FDA BAM.³

Il digerito pancreatico di caseina e il peptone di soia forniscono azoto, carbonio e oligoelementi per la crescita microbica. L'idrogenofosfato dipotassico è usato come agente tampone per controllare il pH del terreno. Il cloruro di sodio è una fonte di elettroliti e mantiene l'equilibrio osmotico. Il glucosio è una fonte di carbonio e di energia. La selettività è data dalla presenza dei sali biliari n° 3 e della novobiocina con una marcata attività antibatterica contro i batteri Gram-positivi.

4A – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 33 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Mescolare bene e, se necessario, riscaldare leggermente per sciogliere completamente la polvere. Distribuire 225 mL in flaconi di capacità adeguata e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente e aggiungere a ciascun flacone da 225 mL, in condizioni asettiche, 2,25 mL di Novobiocin Antimicrobial Supplement (REF 4240045), ricostituito con 5 mL di acqua depurata sterile. Concentrazioni finali: 4,5 mg/225 mL o 20 mg/litro. La soluzione di novobiocina rimanente può essere conservata a 2-8°C per un mese.⁵

4B - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEI FLACONI PRONTI PER L'USO

Il terreno liquido in flacone è pronto all'uso.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	giallo, limpido
Supplemento disidratato	pastiglia bassa e compatta, bianca; soluzione limpida incolore dopo la ricostituzione
pH finale (20-25 °C)	7,4 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tryptic Soy Broth Modified (mTSB)	Terreno di coltura in polvere	402155M2	500 g (15.1 L)
Novobiocin Antimicrobial Supplement	Supplemento liofilizzato	4240045	10 vials (10 mg/flacone)
TSB Modified	Flaconi pronti all'uso	512155M3	6 x 225 mL

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse sterili, pipette e piastre di Petri, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, flaconi, beute, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Alimenti, prodotti di origine animale, campioni della catena alimentare. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.²

9 – PROCEDURA DEL TEST

1. Preparare la sospensione iniziale aggiungendo la porzione di campione in esame al Tryptic Soy Broth modificato con novobiocina (mTSB-N), preriscaldato a 41,5 °C per ottenere un rapporto di 1/10 (ad esempio, 25 g di campione + 225 mL di mTSB-N).





2. Incubare a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 6 ore e successivamente per altre 12-18 ore. Si raccomanda l'uso di sacchetti di omogeneizzazione con una striscia filtrante.
3. Le cellule di *E. coli* O157 vengono separate e concentrate utilizzando microsferi immunomagnetiche rivestite con anticorpi contro *E. coli* O157 dopo 6 ore e, se necessario, dopo altre 12-18 ore di incubazione.
4. 50 μl di brodo concentrato immunomagnetico vengono subcoltivati su Mac Conkey Sorbitol Agar con CT Supplement (CT-SMAC) e su un secondo agar di isolamento selettivo a scelta del laboratorio (ad es. Mac Conkey Sorbitol MUG Agar REF 401669 o Chromogenic *E. coli* O157 Agar REF 405581). CT-SMAC viene incubato a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore. Il secondo agar scelto deve essere incubato seguendo le procedure raccomandate dall'IFU.

10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di microrganismi è indicata da un grado variabile di torbidità, macchie e flocculazione nel terreno liquido.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utente finale può eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> O157 ATCC 43894	41,5°C / 18-24 H / A	crescita
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	41,5°C / 18-24 H / A	inibito

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection; NCTC: National Collection of Type Cultures

12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Tryptic Soy Broth Modified (mTSB) disidratato e pronto all'uso, integrato con Novobiocin Antimicrobial Supplement (REF 4240045), viene testato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di organismi target in provette, incubando a $41,5^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento (G_{rRB}) e nel lotto di prova (G_{rTB}). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *E. coli* O157 ATCC 43888, *E. coli* O157 ATCC 43894, *E. coli* O157 NCTC 12900. L'indice di produttività $G_{\text{rRB}}-G_{\text{rTB}}$ per ciascun ceppo in esame deve essere ≤ 1 .

La selettività è valutata con il metodo delle diluizioni ad estinzione con i seguenti ceppi non target: *E. coli* ATCC 25922, *E. aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212. Dopo l'incubazione a 41°C per 24 ore, la crescita dei ceppi Gram-positivi è totalmente inibita, mentre quella dei ceppi Gram-negativi non target è parzialmente o per nulla inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- Non sono disponibili metodi standard per tutti gli *E. coli* patogeni e i metodi esistenti sono adattati da metodi generali per l'isolamento di *E. coli* o sono stati sviluppati per un gruppo specifico di *E. coli* patogeni. Indipendentemente dai metodi, tuttavia, è importante che gli isolati siano identificati biochimicamente come *E. coli*, oltre a testare i fattori di virulenza associati al rispettivo gruppo patogeno.⁴

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura ed il supplemento qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed il supplemento devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Novobiocin Antimicrobial Supplement è classificato come pericoloso secondo la normativa vigente. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Prestare attenzione all'apertura dei flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro. Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- I flaconi pronti all'uso sono soggetti a sterilizzazione terminale in autoclave e all'aggiunta di novobiocina in condizioni asettiche.
- Il supplemento è sterilizzato mediante filtrazione a membrana.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego dei prodotti, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Flaconi pronti all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a $+2^{\circ}\text{C}$ / $+8^{\circ}\text{C}$ al riparo della luce. In queste condizioni i flaconi sono validi fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. I flaconi estratti dal confezionamento secondario possono essere utilizzati sino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere usati immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare i flaconi con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).





Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplemento liofilizzato

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).











L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

Secondo la norma ISO 21567, il terreno di coltura e la soluzione di novobiocina possono essere conservati fino a un mese a +2°C/+8°C.5 Al momento dell'uso, la novobiocina deve essere aggiunta al terreno di coltura.

15 - Bibliografia

1. Doyle MP, Schoeni JL. Isolation of Escherichia coli 0157:H7 from retail fresh meats and poultry. *App Environ Microbiol* 1987; 53:2394-96.
2. ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for detection of E.coli O157.
3. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM), online. BAM Media M156: Trypticase Soy Broth Modified (mTSB). Content current as of: 12/06/2017
4. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015.
5. ISO 21567:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Shigella spp.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	 Monouso
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

