

**ISTRUZIONI PER L'USO****TCBS KOBAYASHI AGAR****Piastre pronte all'uso***Vibrio parahaemolyticus* su TCBS Kobayashi Agar**1 - DESTINAZIONE D'USO**Dispositivo diagnostico *in vitro*. Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento di *Vibrio* spp. da campioni clinici e da altri materiali.**2 - COMPOSIZIONE - 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.

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I membri del genere *Vibrio* sono bastoncini Gram-negativi, asporigeni, dritti o con un'unica curva rigida. Sono mobili, la maggior parte per mezzo di un singolo flagello polare, osservabile da colture in terreno liquido. La maggior parte produce ossidasi e catalasi e fermenta il glucosio senza produrre gas. L'habitat naturale di *Vibrio* spp. sono le acque salmastre e salate. Diverse specie sono patogene per l'uomo e di norma la patologia enterica si sviluppa con l'ingestione di acqua o frutti di mare contaminati. Le specie che causano più frequentemente diarrea sono *Vibrio cholerae* (l'agente causale del colera), *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fluvialis* e *Vibrio mimicus*. *Vibrio vulnificus* non provoca diarrea, ma è stato isolato dai siti extraintestinali in pazienti settici.¹

TCBS (tiosolfato-citrato-bile-saccarosio) agar è stato sviluppato nel 1963 da Kobayashi, Enomoto, Sakazaki e Kuwahara,² modificando il terreno d'isolamento selettivo di Nakanishi². TCBS Kobayashi Agar è utilizzato per l'isolamento selettivo e differenziale di *Vibrio* spp. da campioni clinici, campioni ambientali e prodotti alimentari.⁴ TCBS Agar è raccomandato da ISO 21872⁵ e da FDA-BAM⁶ per l'isolamento di *Vibrio* spp. dai prodotti alimentari.

Il peptone e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamina B e altri nutrienti essenziali per la crescita batterica. L'inibizione dei batteri Gram-positivi e dei coliformi è ottenuta dalla forte alcalinità e dall'incorporazione dei sali biliari, del tiosolfato di sodio e del citrato di sodio. Il cloruro di sodio è incluso per una crescita ottimale dei vibrioni alofili. Il saccarosio è presente quale carboidrato fermentabile e per ottimizzare il metabolismo dei vibrioni: i batteri fermentanti il saccarosio producono acidità nel terreno con conseguente viraggio degli indicatori di pH (blu di bromotimolo e blu timolo) al giallo. L'inclusione del saccarosio consente la differenziazione preliminare di *V.cholerae*, *V.fluvialis* e *V.alginolyticus* che producono colonie gialle, da *V.parahaemolyticus*, *V.mimicus* e dalla maggior parte dei ceppi di *V.vulnificus* che producono colonie verdi (saccarosio non fermentanti). Il terreno contiene un sistema indicatore della formazione di idrogeno solforato, costituito dal sodio tiosolfato e dal ferro citrato. Il pH alcalino del mezzo migliora il recupero di *V.cholerae*. I batteri enterici sono fortemente inibiti; 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.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

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

5 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
TCBS Kobayashi Agar	Piastre pronte all'uso	542106	2 x 10 piastre ø 90 mm confezionamento primario: 2 sacchetti di cellophane confezionamento secondario: scatola di cartone

6 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Termostato ed altra strumentazione di laboratorio, anse e tamponi da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori per l'identificazione delle colonie.

7 - CAMPIONI

Il terreno può essere seminato direttamente con campioni clinici quali le feci, il tampone rettale, il vomito^{1,7} ed altri materiali come campioni ambientali, frutti di mare, alimenti^{4,5,6}. I campioni devono essere inoculati entro 2-4 ore dalla raccolta; per una conservazione più prolungata utilizzare terreni di trasporto come Cary Blair, poiché i vibrioni sono particolarmente sensibili all'essiccamento.⁷ Non sono richiesti metodi speciali per la raccolta e il trattamento di campioni extra-intestinali (sangue, ferite ecc.) poiché i vibrioni, di regola, sono isolati in coltura pura da questi siti.⁷ Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Operare in accordo alle norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in Laboratorio dei campioni.^{1,7} Per i campioni non di origine clinica fare riferimento alle norme ed agli Standard internazionali applicabili.^{5,6}

8 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno. Inoculare con il materiale di origine clinica strisciando con l'ansa su quattro quadranti della piastra, per disperdere l'inoculo ed ottenere colonie isolate assicurandosi che la semina





sul quarto quadrante non si sovrapponga a quella del primo. In alternativa se il campione è seminato direttamente dal tampone di raccolta, rotolarlo su un'area ristretta in prossimità del bordo piastra quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa. Le feci possono essere diluite 1: 4 in soluzione salina sterile o acqua peptonata. È stato dimostrato che la diluizione riduce significativamente la quantità di flora contaminante senza compromettere l'isolamento degli agenti patogeni presenti in basso numero.¹

Nella fase acuta della diarrea, l'arricchimento delle feci non è generalmente richiesto; tuttavia, quando è necessario, Alkaline Peptone Water è il brodo di arricchimento più comunemente usato per i campioni umani. Incubate le provette a 35-37°C per 18 ore quindi seminare su TCBS Agar. Incubare le piastre di agar TCBS inoculate con il campione o con un campione arricchito in terreno liquido, in aerobiosi a 35-37°C per 18-24 ore.

Secondo il metodo ISO 21872⁵, il rilevamento di vibroni potenzialmente enteropatogeni (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus*) in prodotti destinati al consumo umano ed all'alimentazione animale ed in campioni ambientali nell'area della produzione e della manipolazione degli alimenti, richiedono quattro fasi successive:

1-arricchimento selettivo in Alkaline Peptone Water con incubazione a 41,5°C per 6 ore e/o 37°C per 6 ore; 2-arricchimento secondario in Alkaline Peptone Water con incubazione a 41,5°C per 18 ore e/o 37°C per 18 ore; 3-semina di due terreni selettivi solidi: TCBS Kobayashi Agar incubato a 37°C per 24 ore ed un altro terreno selettivo appropriato, lasciato alla scelta del laboratorio; 4- le colonie presunte di *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus* sono purificate e confermate mediante appropriati test biochimici e/o PCR.

Il recupero di alcune specie di *Vibrio* dai prodotti alimentari può essere migliorato mediante l'uso di temperature di incubazione differenziate in funzione della specie bersaglio o dello stato della matrice alimentare. Consultare la bibliografia pertinente per i dettagli delle procedure per la determinazione di *Vibrio* spp. negli alimenti.^{5,6}

9 - 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:

<i>V. cholerae</i>	Colonie bruno-giallastre circondate da una zona di colore giallo
<i>V. alginolyticus</i>	Grandi colonie gialle
<i>V. fluvialis</i> , <i>V. furnissii</i>	Colonie gialle o traslucide.
<i>V. metschnikovii</i>	Colonie gialle (crescita ridotta).
<i>V. parahaemolyticus</i>	Colonie incolori o verdi con centro blu-verde; il terreno non vira o vira leggermente al blu
<i>V. mimicus</i>	Colonie verdi
<i>V. vulnificus</i>	Colonie verdi (85%) o gialle (15%).
<i>V. hollisae</i>	Colonie verdi (scarsa crescita).
<i>Proteus</i> / Enterococchi	Inibizione parziale o completa. In caso di crescita, piccole colonie da gialle a traslucide.
<i>Pseudomonas</i> / <i>P. shigelloides</i>	Inibizione parziale o completa. In caso di crescita, colonie blu.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Inibizione parziale o completa. In caso di crescita alcuni ceppi producono colonie gialle
<i>Escherichia coli</i>	Inibizione parziale o completa. In caso di crescita, colonie traslucide

Dopo purificazione delle colonie su Nutrient Agar o Tryptic Soy Agar o agar sangue, sottoporre le colonie sospette al test dell'ossidasi e ai test di agglutinazione con antisieri specifici.

10 - CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.⁸

CEPPI DI CONTROLLO		INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie verdi
<i>V. furnissii</i>	NCTC 11218	35-37°C / 18-24H / A	buona crescita, colonie gialle
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	35-37°C / 18-24H / A	crescita inibita
<i>P. mirabilis</i>	ATCC 12453	35-37°C / 18-24H / A	crescita parzialmente inibita, colonie giallo-verdi con centro nero

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

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di piastre di TCBS Kobayashi Agar e della materia prima impiegata per la produzione (terreno in polvere TCBS Kobayashi Agar) vengono testati per la produttività e la selettività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento. La produttività del terreno è valutata con metodo ecometrico semiquantitativo, con incubazione a 37°C per 18-24 ore, con i seguenti ceppi target: *V. parahaemolyticus* NCTC 10885, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. furnissii* NCTC 11218. Le colonie di *V. parahaemolyticus* appaiono di colore verde chiaro con centro verde più scuro, le colonie di *V. furnissii* si presentano di colore giallo; sono anche valutate le cariche microbiche di questi ceppi e se esse sono comparabili nei due lotti, i risultati sono giudicati conformi alle specifiche. Per valutare la selettività del terreno vengono seminate con metodo Miles Misra modificato diluizioni appropriate di una sospensione con densità pari a McFarland 0,5 dei seguenti ceppi non-target: *P. mirabilis* ATCC 10005 *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *A. hydrophila* ATCC 7966, *E. faecalis* ATCC 29212. Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore in aerobiosi, *E. coli*, *A. hydrophila* ed *E. faecalis* risultano completamente inibiti; la crescita dei ceppi non-target Gram-negativi *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* è parzialmente inibita e le colonie mostrano caratteristiche cromatiche tipiche, secondo le specifiche.

12 - LIMITI DEL METODO

- Rari ceppi di *V. cholerae* possono crescere con colonie verde-blu a causa di una ritardata fermentazione del saccarosio.⁴
- Nell'isolamento primario dal campione, *Vibrio parahaemolyticus* può essere confuso con *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* e *Pseudomonas* spp.⁴
- Alcuni ceppi di *Proteus* e di Enterococchi possono presentare crescita e formare piccole colonie incolori; tuttavia, questi organismi si distinguono facilmente. Eventuali coliformi che possono crescere sul terreno non metabolizzano il saccarosio.⁴
- Il test dell'ossidasi ed il test di agglutinazione con antisieri specifici non sono affidabili se eseguiti direttamente sulle colonie coltivate su TCBS Agar. Per l'esecuzione di questi test purificare le colonie su terreni d'uso generale come Nutrient Agar o Tryptic Soy Agar o agar sangue.^{4,7}





- Le colonie gialle dei vibroni fermentanti il saccarosio possono trasformarsi in verdi se le piastre vengono esaminate dopo più di 24 ore di incubazione o se vengono refrigerate dopo l'incubazione.⁷
- L'impiego di un unico terreno è raramente sufficiente per recuperare tutti i patogeni contenuti in un campione. È consigliabile pertanto utilizzare, insieme al TCBS Agar, per l'isolamento di *Vibrio* spp., almeno un terreno aggiuntivo (es. un terreno cromogeno); Per un migliore recupero di *V. vulnificus*, si è dimostrato efficace un terreno contenente cellobiosio-polimixina-B-colistina.⁵
- 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.
- Alcuni ceppi di *V. vulnificus* crescono meglio a 30°C.
- Le colonie microbiche presenti sulla piastra, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche e morfologiche, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura 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 di altri test diagnostici.

13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in piastra qui descritto è un diagnostico *in vitro* 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola piastra del prodotto qui descritto è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerare un "prodotto sterile" non essendo soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti di specifiche definite ed indicate sul documento di Controllo Qualità del prodotto.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre non utilizzate e le piastre seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto 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 del prodotto, 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.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito a 2-8°C. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).

15-BIBLIOGRAFIA

- Public Health England. Investigations of Faecal Specimens for Enteric Pathogens. UK Standards for Microbiology Investigations. 2014, B 30 Issue 8.1.
- Kobayashi T, Enomoto S, Sakasaki R, Kuwahara S. A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's Medium (TCBS Agar Medium). Jap J Bacteriol 1963;18:392-397
- Nakanishi Y. An isolation agar medium for cholerae and enteropathogenic halophilic vibrios. Modern Media 1963; 9:246.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- ISO 21872:2017. Microbiology of the food chain -Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. - Part 1:Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio* parahaemolyticus, *Vibrio* cholerae and *Vibrio* vulnificus.
- U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 9: *Vibrio*. Content current as of:12/16/2019
- Tarr CI, Bopp CI, Farmer III JJ. *Vibrio* and related organisms. In Jorgensen JH, Pfaller MA et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015.
- The Australian Society for Microbiology. Guidelines for Assuring Quality of Medical Microbiological Culture Media. 2nd ed. 2012

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Utilizzare entro
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Non riutilizzare	Fragile maneggiare con cura	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	09/2020
Revisione 5	Rimozione della classificazione obsoleta	03/2023

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

