



TRIPLE SUGAR IRON AGAR ISO

Terreno di coltura in polvere e terreno pronto all'uso

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per la differenziazione di *Enterobacteriaceae*, in particolare *Salmonella*, basata sulla fermentazione dei carboidrati e sulla produzione di idrogeno solforato.

2 – COMPOSIZIONE*

(PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA)

Peptone	20,0 g
Estratto di carne	3,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Lattosio	10,0 g
Saccarosio	10,0 g
Glucosio	1,0 g
Ferro ammonio citrato III	0,3 g
Sodio tiosolfato	0,3 g
Agar	12,5 g
Rosso fenolo	24,0 mg

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La formulazione del Triple Sugar Iron Agar si basa sui tentativi di diversi microbiologi di sviluppare un terreno che aiuti nell'identificazione dei bacilli Gram-negativi intestinali: Russel¹, Kliger,² Krunweide e Kohn³. Nel 1940, Sulkin e Willet⁴ modificarono il terreno di Krunweide e Kohn con l'aggiunta di indicatori H₂S. L'attuale formulazione del Triple Sugar Iron Agar è essenzialmente una modifica di Haja⁵ al Triple Sugar Ferrous Sulphate Medium di Sulkin e Willet.

Triple Sugar Iron (TSI) Agar ISO è destinato alla differenziazione di *Enterobacteriaceae*, in particolare *Salmonella* spp., cresciute su terreni di isolamento primario, basati sulla fermentazione di glucosio, lattosio e saccarosio, con produzione di acidi e gas, e produzione di idrogeno solforato.^{6,7}

Il terreno di coltura è preparato secondo la formula inclusa nella norma ISO 6579⁷ e differisce dalla classica formulazione TSI (REF 402141) per la presenza aggiuntiva di estratto di manzo ed estratto di lievito e concentrazioni leggermente diverse di tiosolfato di sodio e rosso fenolo.

La fermentazione dei tre carboidrati può avvenire sia sulla superficie dello slant che nel fondo con o senza presenza di gas (CO₂ + H₂) e si possono registrare 3 tipologie di reazione:

1-fermentazione del glucosio; 2-fermentazione di glucosio, lattosio e/o saccarosio; 3-nessuna fermentazione.⁸

Nel primo caso, dopo 18-24 ore di incubazione, si osserva una reazione alcalina sullo slant ed una reazione acida nel fondo. Il consumo completo di glucosio, presente in concentrazione dello 0,1%, in superficie, dove esistono condizioni aerobiche, dopo 18-24 ore induce la degradazione ossidativa dei peptoni, con produzione di ammoniaca, alcalinità e viraggio al rosso fenolo (inversione della reazione acido-basica). Al contrario, nel fondo anaerobico i batteri metabolizzano il glucosio producendo ATP e piruvato, che viene convertito in prodotti finali acidi stabili con un viraggio dell'indicatore al giallo (pH acido).

Nel secondo caso i microrganismi fermentano il glucosio e uno o entrambi il lattosio e il saccarosio: dopo 18-24 ore di incubazione si registra una reazione acida sullo slant e nel fondo. Ciò è dovuto all'elevata concentrazione di lattosio e saccarosio: dopo 18-24 ore la loro degradazione non si esaurisce in superficie e quindi non si ha utilizzo di peptoni e quindi nessuna inversione della reazione.

Nel terzo modello si registra una reazione alcalina sia sullo slant che sul fondo. Questo comportamento non è tipico delle *Enterobacteriaceae* ma di alcuni batteri Gram-negativi non enterici, non fermentanti che possono utilizzare i peptoni per crescere (*Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*). Se la degradazione dei peptoni è anaerobica l'indicatore virerà al rosso (pH alcalino) sia in superficie che nel fondo, se la degradazione è aerobica non vi è variazione di colore del rosso fenolo nel fondo.

Il solfato ferroso di ammonio è un indicatore della formazione di idrogeno solforato. Gli organismi produttori di tiosolfato riduttori causano il rilascio di una molecola di solfuro dal tiosolfato di sodio. L'idrogeno solforato reagirà con gli ioni ferrici nel mezzo per produrre solfuro di ferro, un precipitato nero insolubile.

4 – PREPARAZIONE

Sospendere 65 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente. Distribuire in provette e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare in posizione inclinata per ottenere basi profonde e pendenze lievi.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, rosata
Aspetto del terreno in provetta	rosso-arancio, limpido
pH (20-25°C)	7,4 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Triple Sugar Iron Agar ISO	Terreno di coltura in polvere	402141S2	500 g (7,7 L)
Triple Sugar Iron Agar ISO	Provette pronte all'uso	552141S	20 provette con becco di clarino

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, provette sterili con tappo a vite, terreni di coltura e reagenti ausiliari per l'identificazione completa della coltura.



**8 – CAMPIONI**

Colonie pure da una coltura su terreno solido.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Con un ago da inoculo prelevare il centro di una colonia pura ben isolata, inoculare la provetta infilzando prima fino al fondo; ritirare l'ago e quindi strisciare la superficie dello slant. Allentare il tappo della provetta prima dell'incubazione. Incubare in aerobiosi a 37°C per 24 h ± 3 ore.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Interpretare i cambiamenti nel terreno come segue:

a) fondo

- giallo: glucosio positivo (fermentazione del glucosio);
- rosso o invariato: glucosio negativo (nessuna fermentazione del glucosio);
- nero: formazione di idrogeno solforato;
- bolle o crepe: formazione di gas da fermentazione di glucosio;

b) superficie inclinata

- giallo: lattosio e/o saccarosio positivo (fermentazione lattosio e/o saccarosio);
- rosso o invariato: lattosio e saccarosio negativi (nessuna fermentazione di lattosio o saccarosio).

La maggior parte delle colture tipiche di *Salmonella* presentano slant alcalini (rossi) e fondi acidi (gialli) con formazione di gas (bolle) e (in circa il 90% dei casi) formazione di idrogeno solforato (annerimento dell'agar).

Quando viene isolata una *Salmonella* lattosio-positiva, lo slant TSI è giallo.

Interpretazione delle reazioni del TSI con *Salmonella* spp.⁷

	Acidi da glucosio	Gas da glucosio	Acidi da lattosio	Acidi da saccarosio	Produzione H ₂ S
S.Typhi	+	-	-	-	-
S.Paratyphi A	+	+	-	-	-
S.Paratyphi B	+	+	-	-	+
S.Paratyphi C	+	+	-	-	+
S.Gallinarum biovar gallinarum	+	+	-	-	V
S.Gallinarum biovar pullorum	+	+	-	-	V
Altre <i>Salmonella</i> spp.	+	+	-	-	+

Note

Non tutti gli isolati di sierotipi di *Salmonella* mostrano le reazioni contrassegnate con + o -. Le reazioni possono anche variare tra e all'interno dei sierotipi.

Salmonella Typhi è anaerogenica.

V = Risultati variabili.

11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

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 ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPO DI CONTROLLO

S. Typhimurium ATCC 14028

S. flexneri ATCC 12022:

P. aeruginosa ATCC 10145

INCUBAZIONE T° / T / ATM

37°C / 24h / A

37°C / 24h / A

37°C / 24h / A

RISULTATI ATTESI

crescita, slant rosso, fondo giallo, gas+, H₂S+

crescita, slant rosso, fondo giallo, gas-, H₂S-

crescita, slant rosso o invariato, fondo rosso o invariato, gas-, H₂S-

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Triple Sugar iron Agar ISO disidratato viene testato per le prestazioni caratteristiche confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

Nelle provette vengono inoculate colonie pure coltivate su Tryptic Soy Agar di 7 ceppi di *Enterobacteriaceae*: S. Enteritidis ATCC 13076, S. Typhimurium ATCC 14028, E. coli ATCC 25922, C. freundii ATCC 8090, P. rettgeri ATCC 39944, S. flexneri ATCC 12022, S. sonnei ATCC 9290, P. aeruginosa ATCC 10145. Dopo incubazione aerobica a 37°C per 24 ore, si osservano i cambiamenti di colore sullo slant e nel fondo, la produzione di gas e H₂S. Tutti i ceppi mostrano reattività secondo le specifiche.

13 – LIMITI DEL METODO

- È necessario inoculare il terreno con un ago per microbiologia, senza rompere l'agar (non utilizzare anse).
- Eseguire la lettura tra le 18 e le 24 ore di incubazione; letture precoci possono indurre falsi risultati di acidità di tipo A/A oppure non dare tempo sufficiente per la fermentazione degli zuccheri, con conseguente viraggio di colore dell'indicatore; letture ritardate possono dare falsi risultati K/K a causa dell'utilizzo di peptoni e del viraggio alcalino del terreno.⁹
- La produzione di H₂S può mascherare la reazione acida nel fondo, tuttavia la produzione di H₂S richiede condizioni acide, pertanto il fondo deve essere considerato acido in caso di annerimento.
- La produzione di idrogeno solforato può essere evidente su KIA ma negativa su TSI. Studi di Bulmash e Fulton¹⁰ hanno dimostrato che l'utilizzo del saccarosio potrebbe sopprimere i meccanismi enzimatici responsabili della produzione di H₂S. Padron e Dockstader¹¹ hanno scoperto che non tutte le Salmonelle H₂S positive sono positive al TSI.
- Un organismo produttore di H₂S può presentare annerimento sul terreno SIM (positivo) ma nessuno sul terreno TSI.⁹





- Il terreno non contiene inibitori pertanto su di esso può crescere una grande varietà di microrganismi; per questo motivo, prima dell'inoculazione, assicurarsi che i microrganismi siano bacilli Gram-negativi, catalasi positivi.
- L'aggiunta di saccarosio consente la rilevazione precoce dei batteri coliformi che fermentano il saccarosio più rapidamente del lattosio. L'aggiunta di saccarosio aiuta anche l'identificazione di alcuni batteri Gram-negativi che potrebbero fermentare il saccarosio ma non il lattosio.⁸
- Una coltura pura è essenziale quando si inocula il terreno. Se la coltura non è pura, si possono ottenere risultati irregolari.
- Alcuni microrganismi come il gruppo *Klebsiella-Enterobacter* producono una tale abbondanza di gas che il terreno può essere completamente spostato dal gas, provocando l'esplosione del terreno nel tappo. In tal caso, maneggiare la coltura con cautela durante la subcoltura per evitare contaminazioni.
- Assicurarsi che i tappi siano allentati durante l'incubazione poiché per una corretta prestazione del terreno è necessario un libero ricambio d'aria. Se i tappi sono troppo chiusi, si verifica una reazione acida solo sullo slant anche in presenza di fermentazione del glucosio.⁹
- La conferma preliminare delle colture di *Salmonella* non deve basarsi esclusivamente sui risultati del test TSI su agar; ulteriori opportuni test sono necessari per una completa identificazione delle colonie.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura e le provette pronte all'uso 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
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. 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.
- Applicare le buone pratiche di fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Le provette pronte all'uso sono soggette a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni provetta di questo terreno di coltura è monouso.
- 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 non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici 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

Provette pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni le provette sono valide fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le provette estratte dal confezionamento secondario possono essere utilizzate sino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere usate immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare le provette con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).

Terreno disidratato

Conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. 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 (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). Secondo ISO 6579, le provette preparate in laboratorio possono essere conservate a +2°C +8°C fino a 4 settimane.⁴

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Russell FF. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. J Med Res 1911; 25:21
2. Kligler IJ. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. Am J Public Health 1917; 7:1042-1044
3. Krumwiede C, Kohn L. A triple sugar modification of the Russell Double Sugar medium. J Med Res 1917; 37:225.
4. Sulkin SE, Willet JC. A triple sugar ferrous sulphate medium for use in identification of enteric organisms. J Lab Clin Med 1940; 25:649.
5. Hajna AA. Triple sugar iron agar medium for the identification of intestinal group of bacteria. J Bacteriol 1945; 49:516.
6. Atlas R, Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition CRC Press, 1997
7. ISO 6579:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp.
8. Lehman D. Triple sugar iron agar protocols. 30 September 2005. American Society for Microbiology © 2016.
9. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
10. Bulmash JM, Fulton MD. Discrepant tests for hydrogen sulfide. J Bacteriol 1964; 88(2):1813
11. Padron AP, Dockstader WB. Selective medium for hydrogen sulfide production Appl Microbiol 1972; 23:1107





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Monouso	 Fabbricante	 Lato superiore	 Proteggere dall'umidità
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Utilizzare entro	 Fragile maneggiare con cura	 Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	05/2023

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

