

TRYPTONE TRYPTOPHAN MEDIUM

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso in provetta

1- DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido per l'esecuzione del test dell'indolo.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

Triptone	10 g
Sodio cloruro	5 g
Triptofano	1 g

* Le formule possono essere adattate e/o integrate per soddisfare i criteri di prestazione richiesti

3-DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I batteri che possiedono l'enzima triptofanasi sono in grado di idrolizzare e deaminare il triptofano con la produzione di indolo, acido piruvico e ammoniaca.¹ Il test dell'indolo si basa sulla formazione di un complesso di colore rosso quando l'indolo reagisce con il gruppo aldeidico della p-dimetilaminobenzaldeide del reagente di Kovacs, in condizioni acide. Il test dell'indolo è utilizzato come parte delle procedure IMViC, una batteria di test progettati per distinguere tra i membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*.¹ La produzione di indolo è una caratteristica importante nell'identificazione di molti microrganismi, essendo particolarmente utile per separare *E. coli* (positivo) dai membri del gruppo *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia* (per lo più negativi). Il requisito principale per la coltura di un organismo prima di eseguire il test dell'indolo è che il terreno di coltura contenga una quantità sufficiente di triptofano.² Il terreno di coltura con triptofano viene preparato secondo la formulazione inclusa in diverse norme ISO.³⁻⁵ I fattori di crescita essenziali sono forniti dal triptofano, che è privo di carboidrati, ricco di triptofano e fonte di azoto, carbonio e minerali. L'aggiunta di 1 g/L di triptofano migliora la rilevazione della triptofanasi mediante la reazione indolica. Il cloruro di sodio è una fonte di elettroliti e mantiene l'equilibrio osmotico.

4- INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 16 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Sciogliere la polvere mescolando e riscaldando se necessario. Dispensare 5 mL di terreno in provette e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

5-CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione e del flacone	limpido, giallo chiaro
pH (20-25°C)	7,5 ± 0,2

6-MATERIALI FORNITI-CONFEZIONAMENTO

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Tryptone Tryptophan Medium	Terreno in polvere	4021652	500 g (31,3 L)
Tryptone Tryptophan Medium	Terreno pronto all'uso in provette	552165	20 provette

7-MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette con tappo a vite, anse sterili, Reagente di Kovacs' (REF 19171000), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8-CAMPIONI

I campioni sono costituiti da colonie cresciute su terreni di coltura.

9-PROCEDURA DELL'ANALISI

- Inoculare il terreno Tryptone Tryptophan Medium utilizzando un inoculo leggero di una coltura pura di 18-24 ore e incubare a:
44°C o 37°C per 24 ore per il test di conferma di *E. coli*,
37°C per 24 ore per il test di conferma di *E. coli* O157 secondo la ISO 16654,³
37°C per 24 ore, per la differenziazione di *Salmonella* (generalmente indolo negativa) da *E. coli* (indolo positiva) secondo la norma ISO 6579,⁴
30°C per 48 ore, per la biotipizzazione di *Y. enterocolitica* secondo la ISO 10273,⁵
- Aggiungere 1 mL di Reagente di Kovács' e agitare delicatamente.
- Esaminare lo strato superiore del liquido dopo circa 1 minuto per verificare la comparsa di un colore rosso-rosa.

10-LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultato positivo: formazione di una colorazione da rosa a rossa entro 1 minuto (che normalmente si verifica entro pochi secondi)
Risultato negativo: nessun cambiamento di colore, lo strato di reagente rimane giallo o leggermente torbido.

11-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 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.

Controllo positivo: *Escherichia coli* ATCC 25922

Controllo negativo: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

ATCC is a trademark of American Type Culture Collection

12 - VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di ogni lotto di Tryptone Tryptophan Medium disidratato e di terreno pronto in provetta, viene testato con ceppi positivi e negativi. Ceppi positivi all'indolo (comparsa di un colore rosso-rosa sullo strato superiore del





terreno di coltura entro pochi secondi): *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157 H7 ATCC 43888, *Y. enterocolitica* ATCC 23715, *P. vulgaris* ATCC 13315, *P. rettgeri* ATCC 39944. Ceppi indolo-negativi (nessun cambiamento di colore dello strato superiore del terreno entro 3 minuti): *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Enteritidis* ATCC 13076, *E. aerogenes* ATCC 13048, *C. freundii* ATCC 43864.

13-LIMITI DEL METODO

- Il test dell'indolo è un aiuto nella differenziazione dei microrganismi. Per un'identificazione completa si consigliano altri test adeguati.
- Il cambiamento di colore del Reagente Kovacs da giallo a marrone indica una conservazione impropria, che può causare reazioni più deboli.

14-PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato 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 produzione dei terreni.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Le provette ed i flaconi pronti all'uso sono soggetti 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 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

Provette pronto 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 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).

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 6579, le provette preparate in autonomia possono essere conservate a +2°C +8°C al buio per un massimo di 3 mesi.⁴

16-BIBLIOGRAFIA

- Maria P. MacWilliams. Indole Test Protocol. ASM, 08 December 2009, American Society for Microbiology © 2016.
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- ISO 16654:2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
- ISO 6579-1:2017. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* spp.
- ISO 10273:2017 -Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica*.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 06	Aggiornamento del contenuto e del layout	04/2023

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

