

**ISTRUZIONI PER L'USO****TRYPTIC SOY AGAR**

Terreno pronto all'uso in flacone

*Bacillus cereus* su Tryptic Soy Agar**1 - DESTINAZIONE D'USO**

Diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale per la coltivazione, l'isolamento ed il mantenimento di microrganismi esigenti e moderatamente esigenti. Per l'enumerazione microbica in prodotti farmaceutici non sterili e cosmetici. Addizionato di sangue defibrinato animale, Tryptic Soy Agar è indicato per l'isolamento e la coltivazione di microrganismi esigenti e non esigenti da campioni clinici ed altri materiali e per la determinazione delle proprietà emolitiche dei batteri.

2 - COMPOSIZIONE - FORMULA TIPICA *

Digerito pancreatico di caseina	15 g
Peptone di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 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

Tryptic Soy Agar (TSA) è uno dei terreni di coltura più utilizzati in microbiologia clinica ed industriale. TSA ha una moltitudine di applicazioni nei laboratori clinici e non clinici tra cui l'isolamento, la coltivazione e la purificazione di colonie di microrganismi non esigenti e moderatamente esigenti ed il mantenimento dei ceppi in coltura.¹ Poiché non contiene i fattori X e V, esso è adatto per l'identificazione di *Haemophilus* spp., aggiungendo sulla superficie dell'agar dischi o strisce impregnate di Fattore X (emina) e Fattore V (NAD).² TSA è indicato come terreno di riferimento quando si debba misurare la produttività dei terreni selettivi.³ TSA è il terreno indicato come "casein soya bean digest agar" dal metodo armonizzato EP, USP, JP⁴ per la conta microbica totale nei prodotti farmaceutici non sterili. È raccomandato dalla norma ISO 21149 per l'enumerazione ed il rilevamento dei batteri mesofili aerobi nei cosmetici.⁵

Tryptic Soy Agar può essere addizionato di sangue defibrinato animale (a concentrazioni tra il 5% e il 7%) per la preparazione di un terreno più nutriente, adatto alla crescita di organismi esigenti; l'aggiunta di sangue animale consente la determinazione delle proprietà emolitiche dei ceppi isolati come utile strumento nell'orientamento dell'identificazione batterica.

TSA può essere addizionato con 0,7 g/L di lecitina e 5 g/L di polisorbato 80 per la determinazione del contenuto microbico di prodotti, aree sanitarie e contenitori, trattati con disinfettanti.⁶

TSA con l'aggiunta di sale può essere utile per determinare il livello di alotolleranza dei microrganismi.⁶

Tryptic Soy Agar è preparato con peptoni di caseina e di soia selezionati che rendono il terreno particolarmente nutriente grazie al loro contenuto in azoto organico, sotto forma di aminoacidi e polipeptidi. Il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico e l'agar è l'agente solidificante del terreno.

4 - METODO DI PREPARAZIONE

Sciogliere il contenuto del flacone in un'autoclave a $100 \pm 2^\circ\text{C}$ o in un bagnomaria termoregolato a 100°C . In alternativa, il flacone può essere posto in un recipiente contenente acqua, che viene posta su una piastra riscaldante e portata ad ebollizione; allentare leggermente il tappo prima del riscaldamento. Raffreddare il terreno a $47-50^\circ\text{C}$ e, se necessario, aggiungere sangue defibrinato (ad es. 5% sangue di montone) o altri supplementi. Distribuire in piastre o provette sterili con le precauzioni dell'asepsi.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno
pH (20-25°C)

limpido di colore giallo chiaro
 $7,3 \pm 0,2$

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezioni
Tryptic Soy Agar	Terreno pronto all'uso in flacone	5121502	6 x 100 mL; confezionamento primario: flacone di vetro con tappo a vite; confezionamento secondario: scatola di cartone CND: W0104010306; EDMA 14.01.03.01; RDM: 1554934/R
		5121503	6 x 200 mL; confezionamento primario: flacone di vetro con tappo a vite; confezionamento secondario: scatola di cartone CND: W0104010306; EDMA 14.01.03.01; RDM: 1554935/R

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria o piastra riscaldante, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, provette sterili, anse, aghi, tamponi sterili da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 - CAMPIONI

Il terreno senza addizione di sangue animale non è adatto alla semina diretta di campioni clinici. Generalmente il terreno qui descritto è utilizzato per la sub-coltura di microrganismi coltivati su altri terreni di coltura.





Campioni non di origine clinica analizzati con Tryptic Soy Agar possono essere prodotti farmaceutici non sterili e cosmetici. Consultare la letteratura citata per le procedure di raccolta e preparazione dei campioni.^{4,5}

Le piastre di agar sangue preparate con TSA possono essere inoculate direttamente con una varietà di campioni clinici umani raccolti da siti sterili e non. Consultare la bibliografia citata per i campioni da esaminare in rapporto a specifiche infezioni.⁷⁻⁹ Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica ed applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, il trasporto e la conservazione dei campioni clinici.⁷

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Portare le piastre e/o le provette a temperatura ambiente e lasciare asciugare la superficie del terreno in piastra.

Terreno in piastra

Per la sub coltura delle colonie, inoculare, con un ago o un'ansa da batteriologia il terreno in piastra con una colonia coltivata su altro terreno d'isolamento. Incubare alla temperatura e per il tempo previsto dalle proprie procedure ed in funzione del microrganismo che si desidera coltivare.

Inoculare le piastre di agar sangue preparate con TSA, con il campione clinico in esame, 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 una area ristretta in prossimità del bordo piastra, quindi strisciare su tutta la superficie del terreno con un'ansa.

Incubare a 35-37 °C in aerobiosi o in atmosfera al 5-10% di CO₂ ed osservare dopo 18-24, 48 e, se necessario, 72 ore.

L'utilizzatore è responsabile della scelta del tempo di incubazione, della temperatura e dell'atmosfera appropriata, a seconda del campione in esame, delle esigenze nutrizionali degli organismi da isolare e dei protocolli operativi locali applicabili.

Per l'esame di prodotti farmaceutici e cosmetici riferirsi ai metodi descritti dalla Farmacopea⁴ e dalla norma ISO applicabile⁵.

Terreno in provetta

Inoculare con l'ansa sulla superficie del clarino. Normalmente una temperatura di incubazione di 35 ± 2°C per 18-24 ore è adeguata per la coltivazione di aerobi comuni e anaerobi facoltativi. Incubare alla temperatura e per il tempo previsto dalle proprie procedure ed in funzione del microrganismo che si desidera coltivare.

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di microrganismi è indicata dalla comparsa di colonie di varia morfologia e dimensione sulla superficie del terreno. Le caratteristiche delle crescite sono in stretto rapporto al tipo o ai tipi di microrganismi coltivati.

Su piastre con sangue di montone si possono evidenziare i seguenti tipi di emolisi:

1. α-emolisi: emolisi parziale delle emazie con la formazione di aloni grigio-marrone-verdastro attorno alle colonie.
2. β-emolisi: emolisi complete dei globuli rossi con la formazione di una zona trasparente attorno alle colonie.
3. γ o non-emolisi: i globuli rossi non sono lisati e non vi è alcuna modifica del terreno attorno alle colonie.
4. Emolisi α-prime: presenza di una piccola zona di emolisi completa del sangue attorno alla colonia, circondata da un alone di lisi parziale delle emazie di colore verdastro; questo tipo di emolisi è piuttosto rara.

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 responsabilità 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 del terreno privo di supplementi.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE (T° / t / ATM)	RISULTATI ATTESI
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35-37°C / 24H / A	buona crescita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	35-37°C / 24H / A	buona crescita

Per il controllo di qualità nel settore farmaceutico e cosmetico fare riferimento alla Farmacopea Europea edizione corrente ed alla norma ISO 21149.

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

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di flaconi di Tryptic Soy Agar e della materia prima impiegata per la produzione, terreno in polvere Tryptic Soy Agar REF 402150, (test batch: TB), vengono testati per la produttività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato (RB).

La produttività del TSA non supplementato è testata con un test quantitativo con i seguenti ceppi: *P.aeruginosa* ATCC 9027, *E.coli* ATCC 25922, *B.cereus* ATCC 11778, *B.subtilis* ATCC 6633, *S.aureus* ATCC 6538, *S.aureus* ATCC 25923, *L.monocytogenes* ATCC 13932, *C.albicans* ATCC 10231, *A.brasiliensis* ATCC 16404. Le piastre TSA vengono inoculate con appropriate diluizioni decimali in soluzione salina delle sospensioni delle colonie e incubate a 30-35°C per 24-72 ore. Le colonie sviluppate sulle piastre sono contate per entrambi i lotti ed è calcolato il rapporto di produttività ($Pr = U_{FC_{TB}}/U_{FC_{RB}}$). Se $Pr \geq 0,7$ e se la morfologia delle colonie è tipica, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La produttività del TSA addizionato con il 5% di sangue defibrinato di montone è valutata con tecnica ecometrica semiquantitativa con i seguenti ceppi: *S.pyogenes* ATCC 19615, *S.agalactiae* ATCC 12386, *S.aureus* ATCC 25923. Dopo incubazione a 35-37°C per 18-24 ore vengono valutati e registrati i tipi di emolisi e l'entità della crescita. Tutti i ceppi mostrano una buona crescita con modelli emolitici tipici.

13 - LIMITI DEL METODO

- La crescita ed il tipo di emolisi sulle piastre di agar sangue preparate con TSA dipendono dalle esigenze metaboliche di ciascun microrganismo; è possibile che alcuni ceppi non siano in grado di coltivare sul terreno e/o dimostrino modelli emolitici diversi dall'atteso.
- Sulle piastre al sangue di montone preparate con TSA, non cresce *Haemophilus influenzae*, che richiede sia il fattore X che il fattore V,¹⁰ né si sviluppano adeguatamente *Neisseria*, *Mycobacterium*, *Bordetella* ed altri microrganismi con particolari esigenze nutritive. Per l'isolamento di queste specie utilizzare terreni di coltura specifici.
- Quando si usano piastre al sangue preparate con TSA, per isolare e riconoscere i patogeni contenuti nel campione, seminare il materiale in esame anche su appropriati terreni selettivi e sull'agar cioccolato.
- Le colonie microbiche presenti sulle piastre, anche se differenziate sulla base delle loro caratteristiche cromatiche, morfologiche ed emolitiche, 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.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno in flacone 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.
- Fare attenzione quando si aprono i flaconi con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Quando si utilizza una piastra riscaldante e/o un bagnomaria, far bollire sufficientemente a lungo per sciogliere l'intero terreno.
- Indossare guanti di protezione dal calore durante la procedura di liquefazione del terreno. Non mettere i flaconi caldi a contatto con il ghiaccio o in acqua fredda per accelerare il raffreddamento poiché ciò potrebbe causare rotture del vetro.
- Il tempo necessario per la completa liquefazione del terreno può variare considerevolmente e dipende dalla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento, dalla sua potenza, dalle dimensioni e dal volume del flacone.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire le piastre e/o le provette non utilizzate e le piastre e/o le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo e sterilizzate, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- 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.

15 - 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. Non utilizzare i flaconi oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, i flaconi possono essere utilizzati fino alla data di scadenza. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. I flaconi aperti devono essere utilizzati immediatamente per la preparazione di piastre e/o provette. Non utilizzare i flaconi se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, torbidità anomala, colore alterato, presenza di precipitato).

L'utilizzatore è responsabile della correttezza della preparazione delle provette e/o delle piastre. L'utilizzatore è responsabile della validazione della shelf life delle piastre e delle provette preparate, in funzione del metodo di stoccaggio applicato (temperatura e confezionamento) e dei supplementi impiegati.

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Atlas R. Parks LC. Handbook of Microbiological Media. 2nd edition CRC Press, 1997
2. Ledebner NA, Doern GV. Haemophilus. In Jorgensen JH, Carroll KC, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.667.
3. ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media
4. European Pharmacopoeia, current edition
5. ISO 21149:2017. Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing; Bacteriology. In Jorgensen JH, Carroll KC, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015. p.270.
8. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneva: World Health Organization.
9. Public Health England- UK Standards for microbiology investigations (UK SMI): searchable index. 9 January 2019
10. Nye KJ, Fallon D, Gee B, Messer S, Warren RE, Andrews N. A comparison of blood Agar supplemented with NAD with plain blood agar and chocolate blood agar in the isolation of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus Influenzae* from sputum. Bacterial Methods Evaluation Group J Med Microbiol 48 (12), 1111-1114 Dec 1999

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 5	Aggiornamento del layout e del contenuto in accordo a IVDR 2017/746	09/2021

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

