



## TRIPLE SUGAR IRON AGAR USP

Terreno di coltura pronto per l'uso in provetta



Triple Sugar Iron Agar USP - da sinistra: provetta non inocolata, *S.Typhimurium*, *E.coli*.

### DESTINAZIONE D'USO

Terreno per la differenziazione dei membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, soprattutto *Salmonella* spp., isolati da campioni clinici e da altri materiali.

### FORMULA TIPICA \*

Peptocomplex	20,000 g
Lattosio	10,000 g
Saccarosio	10,000 g
Glucosio	1,000 g
Ferro solfato	0,200 g
Sodio cloruro	5,000 g
Sodio tiosolfato	0,200 g
Agar	14,000 g
Rosso fenolo	0,025 g
Acqua purificata	1000 ml

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

### DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Triple Sugar Iron (TSI) Agar è un terreno differenziale frutto di modifiche introdotte da Krumwiede e Kohn e da Hajna al terreno originariamente descritto da Sulkin a Willet. Rispetto al terreno Kligler Iron Agar, Triple Sugar Iron Agar contiene anche un terzo carboidrato, il saccarosio, utile per differenziare alcuni enterobatteri fermentanti il saccarosio ma non fermentanti il lattosio, come *Proteus* e *Citrobacter*. Il terreno qui descritto corrisponde alla formulazione riportata su USP XXI ed.

Triple Sugar Iron Agar USP è utilizzato per la differenziazione degli enterobatteri, soprattutto *Salmonella* spp., coltivati su terreni selettivi o moderatamente selettivi, in base alla fermentazione di glucosio, lattosio e saccarosio con produzioni di acidi e gas ed alla produzione di idrogeno solforato.

La fermentazione degli zuccheri presenti può avvenire sia sulla superficie del becco di clarino sia in profondità con o senza presenza di gas (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>).

Per quanto riguarda la fermentazione degli zuccheri su TSI, si possono registrare tre modelli di reazione:

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

Nel primo caso dopo 18-24 ore di incubazione si osserva una reazione alcalina sullo slant e una reazione acida in profondità. L'utilizzazione completa del glucosio, presente alla concentrazione dello 0,1%, in superficie, dove esistono condizioni aerobiche, dopo 18-24 ore induce un attacco catabolico dei peptoni da parte dei microrganismi con produzione di ione ammonio, alcalinità e viraggio del rosso fenolo verso il rosso (reversione della reazione da acida ad alcalina). In profondità, invece, dove esistono condizioni anaerobiche si registra unicamente una fermentazione del glucosio a prodotti acidi stabili con conseguente viraggio dell'indicatore verso il giallo (pH acido).

Nel secondo caso, quando siano presenti microrganismi che fermentano il glucosio ed uno o entrambi gli altri due zuccheri, si registra dopo 18-24 ore di incubazione una reazione acida in superficie ed in profondità. Ciò è dovuto alla elevata concentrazione del lattosio e del saccarosio: dopo 18-24 ore non è ancora terminata in superficie la loro degradazione e quindi non si ha alcun attacco dei peptoni e quindi nessuna reversione della reazione.

Nel terzo modello sperimentale si registra una reazione alcalina sia in superficie che in profondità. Questo comportamento non è tipico delle *Enterobacteriaceae* ma di alcuni batteri Gram negativi non enterici presenti nell'intestino che non fermentano i tre zuccheri ma possono degradare i peptoni (*Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*). Se la degradazione dei peptoni è anaerobica si ha un viraggio dell'indicatore verso il rosso (pH alcalino) sia in superficie che in profondità, se la degradazione è aerobica, in profondità non c'è alcun cambiamento di colore del terreno.

Su TSI si può osservare anche la produzione di acido solfidrico a partire dal sodio tiosolfato e dal ferro solfato quando l'ambiente sia acido. Esso è evidenziato da un apposito indicatore, il ferro ammonio citrato, che in presenza di H<sub>2</sub>S precipita sotto forma di ferro solfuro nero.

### CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in provetta  
pH (20-25 °C)

Rosso-arancio limpido.  
7,3 ± 0,2

### MATERIALI FORNITI

Provette di vetro con tappo a vite pronte all'uso contenenti il terreno coltura Triple Sugar Iron Agar USP, solidificato a becco di clarino

**MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI**

Termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, anse ed aghi da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

**CAMPIONI**

Il campione è costituito da colture pure di enterobatteri isolati da campioni clinici o altri materiali.

**PROCEDURA DELL'ANALISI**

Caricare un ago da batteriologia con la crescita di una colonia pura del microrganismo da identificare. Sottoporre ad esame numerose colonie coltivate sulla piastra d'isolamento primario. Se si ritiene che le colonie non siano pure ritrapiantarle su Tryptic Soy Agar ed con esse seminare le provette di TSI.

Seminare infiggendo l'ago fino sul fondo del terreno e strisciando abbondantemente sulla superficie del becco di clarino. Incubare a 35-37°C per 18-24 ore con i tappi allentati.

**LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Dopo l'incubazione, osservare e riportare:

- Il colore del terreno in superficie e in profondità; il colore giallo è indice di acidità, il colore rosso o viola è indice di alcalinità; i modelli possibili sono i seguenti: becco alcalino-fondo acido (riportare con la sigla K/A): solo fermentazione del glucosio ed attacco catabolico dei peptoni in superficie; becco e fondo acidi (riportare con la sigla A/A): fermentazione di glucosio e di lattosio e/o saccarosio; becco e fondo alcalini (riportare con la sigla K/K): nessuna fermentazione degli zuccheri, attacco catabolico dei peptoni.
- La presenza di gas in profondità, dovuta alla produzione di CO<sub>2</sub> e di H<sub>2</sub> evidenziata da una singola bolla, da bolle molteplici, dalla rottura del terreno, dallo spostamento verso l'alto di una parte del terreno.
- La presenza del precipitato nero indice di produzione di H<sub>2</sub>S evidenziata con l'annerimento dell'intero fondo che ne maschera il colore giallo, come un anello nero sulla parte superiore del fondo, come annerimento del fondo senza mascheratura del colore giallo del fondo stesso. In qualsiasi caso, quando vi è annerimento del fondo esso deve essere considerato acido.

Su Triple Sugar Iron Agar USP possono essere osservate tutte le combinazioni delle reazioni sopra descritte, quindi è importante prendere nota dell'espressione delle tre reazioni (fermentazione degli zuccheri, produzione di gas, produzione di H<sub>2</sub>S).

Nella tabella che segue, tratta da Mac Faddin, J.F.(1985), sono riportati i modelli di reazione di alcune *Enterobacteriaceae*

<b>Microrganismo</b>	<b>Lac</b>	<b>Suc</b>	<b>Glu</b>	<b>Gas</b>
<i>Edwardsiella</i>	-	-	A	+
<i>Escherichia coli</i>	A <sup>1</sup>	V	A	V <sup>+</sup>
<i>Shigella</i>	V <sup>-3</sup>	V <sup>-1</sup>	A	V <sup>-2</sup>
<i>Klebsiella</i>	A	A	A	+
<i>Enterobacter</i>	V	V <sup>+</sup>	A	V <sup>-6</sup>
<i>Hafnia</i>	V <sup>-</sup>	V <sup>-</sup>	A	V <sup>+</sup>
<i>Serratia</i>	V <sup>-</sup>	A	A	V <sup>-</sup>
<i>Morganella</i>	-	-	A	V <sup>+</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	-	V <sup>-1</sup>	A	+
<i>Proteus vulgaris</i>	-	A	A	V <sup>-7</sup>
<i>Proteus rettgeri</i>	-	V <sup>-1</sup>	A	V <sup>+</sup>
<i>Salmonella</i>	-4	-	A	V <sup>+</sup>
<i>Salmonella arizonae</i>	V <sup>+1</sup>	V <sup>-</sup>	A	+
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	V	V <sup>-</sup>	A	+
<i>Citrobacter diversus</i>	V	V <sup>-</sup>	A	+
<i>Citrobacter freundii</i>	A <sup>1</sup>	V <sup>-</sup>	A	+
<i>Yersinia</i>	-	V	A	V

**Note**

Lac: fermentazione del lattosio; Suc: fermentazione del saccarosio; Glu: fermentazione del glucosio; A: reazione acida; V: variabile; V<sup>+</sup>: variabile, di solito positivo; V<sup>-</sup>: variabile, di solito negativo. 1: la reazione può essere ritardata; 2: *S. flexneri* ser.6 positiva alla produzione di gas in piccola quantità; 3: di solito negativo con l'eccezione di *S. sonnei* (la reazione acida può essere ritardata); 4: anche se rare vi sono varianti lattosio positive di *S. Typhi*; 5: *S. Typhi* può mostrare un anello di annerimento ma la sua presenza non è di valore diagnostico, per *S. Paratyphi A H<sub>2</sub>S+*, la reazione positiva è ritardata; 6: *E. agglomerans* è variabile alla produzione di gas; 7: nel caso fosse prodotto gas, esso è in piccole quantità.



### CONTROLLO QUALITA'

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. E' 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE: T° / t / ATM	SPECIFICHE
<i>S.typhimurium</i> ATCC 14028	37°C / 18-24h / A, con tappi allentati	Buona crescita, becco rosso, fondo giallo, gas +, H <sub>2</sub> S +
<i>E.coli</i> ATCC 25922	37°C / 18-24h / A, con tappi allentati	Buona crescita, becco giallo, fondo giallo, gas +, H <sub>2</sub> S -
<i>S.flexneri</i> ATCC 12022	37°C / 18-24h / A, con tappi allentati	Buona crescita, becco rosso, fondo giallo, gas -, H <sub>2</sub> S -

A: Aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection

### LIMITI DEL METODO

- E' necessario inoculare per infissione il terreno con un ago da microbiologia senza rompere l'agar (non usare anse).
- E' essenziale eseguire la lettura tra le 18 e le 24 ore di incubazione; letture precoci possono indurre falsi risultati di acidità del tipo A/A oppure non vi è tempo sufficiente per la fermentazione degli zuccheri con conseguente viraggio dell'indicatore; letture ritardate possono dare falsi risultati K/K a causa dell'utilizzo dei peptoni e conseguente viraggio alcalino del terreno.
- La produzione di H<sub>2</sub>S può mascherare la reazione acida sul fondo, tuttavia la produzione di H<sub>2</sub>S richiede condizioni acide quindi il fondo si deve considerare acido quando vi è annerimento.
- E' stato riportato da Bulmash e Fulton che la fermentazione del saccarosio può sopprimere il meccanismo enzimatico responsabile della produzione di idrogeno solforato. Padron e Dockstader riferiscono che non tutti i ceppi di *Salmonella* produttori di H<sub>2</sub>S presentano annerimento della provetta di TSI, mentre risultano H<sub>2</sub>S+ su Kligler Iron Agar.
- Il terreno non contiene inibitori quindi una grande varietà di microrganismi può coltivare su di esso; per questa ragione prima della semina assicurarsi che la colonia sia catalasi positiva e si sia in presenza di bacilli Gram negativi.
- Assicurarsi che le colonie da sottoporre al test siano pure; la procedura migliore è una subcoltura dal terreno d'isolamento su Tryptic Soy Agar e l'esecuzione del test sulle colonie coltivate su quest'ultimo terreno. Nel caso la coltura non fosse pura si ottengono risultati irregolari.
- Le specie del gruppo *Klebsiella-Enterobacter* producono una tale quantità di gas per cui il terreno è spinto verso il tappo della provetta; in questi casi porre molta attenzione nei successivi ri-trapianti per evitare contaminazioni.
- E' essenziale che i tappi siano allentati durante l'incubazione poiché per un corretto svolgimento delle reazioni alcalina sul becco del clarino vi deve essere passaggio d'aria nella provetta. Nel caso i tappi siano troppo chiusi si realizza una reazione acida sul becco anche in presenza della sola fermentazione del glucosio.
- Nel caso non si osservi alcuna reazione né sul becco né sul fondo, assicurarsi che il terreno sia stato correttamente inoculato e che vi sia crescita microbica. Se la crescita è presente procedere con altri sistemi di identificazione batterica.
- Il viraggio al giallo sul becco del clarino e nessun cambiamento di colore del fondo può avere due cause: la semina di una colonia Gram positiva fermentante solo il lattosio o il saccarosio oppure l'assenza di infissione in profondità.
- Questo terreno non deve essere usato per la semina diretta del campione..
- Il terreno 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 dei test microscopici e/o di altri test diagnostici.
- L'identificazione completa dei microrganismi coltivati sul terreno deve essere effettuata con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa, dopo purificazione delle colonie con subcoltura su terreno appropriato.

### PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente.
- Il prodotto qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* sugli animali e quelli durante il processo 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 qui descritto con le precauzioni d'uso specifiche per i prodotti potenzialmente infettivi (non ingerire). Scaricare dal sito web [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it) il documento con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alla TSE.
- Il prodotto qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, per uso professionale. Esso deve essere usato in Laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni poiché le colture microbiche e le provette seminate sono da considerare come potenzialmente infettive.
- La singola provetta del prodotto qui descritto è monouso.
- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave ma, non essendo sottoposto a test di sterilità con metodo normato, non è etichettato come "sterile" e deve essere quindi inteso come prodotto a biocontaminazione controllata e nei limiti di specifiche definite.
- Prima dell'utilizzo verificare l'integrità del tappo a vite.
- Non utilizzare le provette oltre la data di scadenza. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, colore alterato).



- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- Sterilizzare le provette dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le provette non utilizzate e quelli inoculate con i campioni o con i ceppi microbici 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](http://www.biolifeitaliana.it).

### CONSERVAZIONE

Conservare a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta.

### BIBLIOGRAFIA

- Bulmash, J.M., Fulton, M.D. (1964) Discrepant tests for hydrogen sulfide. J.Bacteriol. 88(2), 1813
- Hajna, A. A. (1945) Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria. J. Bacteriol. 49:516-517.
- Krumwiede, C., Kohn, L. (1917-1918) A triple sugar modification of the Russell Double Sugar medium. J. Med. Res. 37, 225.
- Mac Faddin, J.F. (1985) Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Padron, A.P., Dockstader, W.B. (1972) Selective medium for hydrogen sulfide production. Appl. Microbiol. 23, 1107.
- Sulkin, S.E., Willett, J.C. (1940) A Triple Sugar-Ferrous Sulfate medium for use in identification of enteric organisms. J.Lab. Clin. Med., 25, 649.
- USP (1985), XXI ed

### CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	Cat. N°	Confezione
Triple Sugar Iron Agar USP	Terreno pronto all'uso in provetta di vetro 17x125 mm, con fondo piatto e tappo a vite.	552141	20 provette in scatola di cartone

CODICE CND: W0104010206 – RDM: 1514939/R



Biolife Italiana S.r.l., Viale Monza 272, Milano, Italia.