

## BD Tryptic Soy Agar

### USO PREVISTO

**BD Tryptic Soy Agar** (agar soia triptico), fornito in flaconi, è un terreno universale parzialmente completo che, dopo l'allestimento in capsule di Petri o provette, sostiene la crescita di microrganismi non esigenti e moderatamente esigenti. In microbiologia clinica, il terreno non viene usato per l'isolamento di patogeni dai campioni clinici ma per la coltura di ceppi batterici e con l'aggiunta di sangue può essere utilizzato per l'isolamento primario.

### PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.

Tryptic Soy Agar, grazie alla sua composizione nutritiva, è largamente utilizzato da diversi anni ed è incluso nella farmacopea statunitense e in quella europea come terreno agar con estratto di caseina di soia per la conta totale degli aerobi nelle procedure dei test sui limiti microbici.<sup>1,2</sup> Il terreno completo è usato per vari scopi, ad es. la conservazione delle stock-culture, la conta delle piastre e l'isolamento dei microrganismi da un'ampia gamma di materiali.<sup>3-5</sup> Il terreno è incluso nella raccolta di tecniche utilizzate per le analisi di acque, liquami e alimenti.<sup>6,7</sup>

Questo terreno trova limitato impiego in microbiologia clinica perché alimenta la crescita di vari batteri esigenti. Tuttavia, poiché Tryptic Soy Agar non contiene i fattori di crescita X e V, può essere usato per stabilire il fabbisogno di questi fattori di crescita da parte degli isolati di *Haemophilus* spp., aggiungendo strisce di fattori X, V e XV alle piastre inoculate.<sup>8</sup> **BD Tryptic Soy Agar** può essere usato anche come terreno per conservare o passare in subcoltura i ceppi di riferimento, ad es. *Enterobacteriaceae* e stafilococchi, ma senza supplementi non viene utilizzato come terreno di isolamento primario per applicazioni cliniche. Dopo l'aggiunta di sangue (ad es. 5% di sangue di montone), il terreno può essere usato per l'isolamento dei batteri da campioni clinici.<sup>9,10</sup>

**BD Tryptic Soy Agar** contiene peptoni di caseina e soia che rendono il terreno nutritivo fornendo azoto organico, in particolare aminoacidi e peptidi a catena lunga. L'equilibrio osmotico è mantenuto dal cloruro di sodio. **BD Tryptic Soy Agar** (terreni in flacone) sono terreni parzialmente completi (semi-finiti) forniti in flaconi, da cui è possibile ricavare terreni su piastra o in provetta. Questi terreni vengono allestiti utilizzando terreni deidratati **Difco**.

### REAGENTI

#### BD Tryptic Soy Agar

Formula\* per litro di acqua purificata

Triptone <b>Bacto</b> (digerito pancreatico di caseina)	15,0 g
Soytone <b>Bacto</b> (digerito papainico di farina di soia)	5,0
Cloruro di sodio	5,0
Agar	15,0

pH 7,3 ± 0,2

\*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

### PRECAUZIONI

**IVD**. Solo per uso professionale.

Non usare i flaconi se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazioni cromatiche, essiccamento, fessurazioni o altri segni di deterioramento. Per ultimare la preparazione del terreno in flacone parzialmente completo, attenersi alle tecniche previste e osservare le avvertenze riportate nella sezione **PROCEDURA – Preparazione dei reagenti**. Per maneggiare i prodotti in condizioni asettiche, riconoscere i rischi biologici e smaltire i prodotti usati, consultare le **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**.

## CONSERVAZIONE E VITA UTILE

Alla consegna, conservare i flaconi al buio a 5 – 25 °C. Evitare congelamento e surriscaldamento. Il terreno può essere utilizzato fino alla data di scadenza e incubato per il tempo consigliato. I flaconi prelevati dalle confezioni già aperte possono essere usati fino alla data di scadenza. I flaconi aperti devono essere utilizzati immediatamente. Liquefare il terreno prima di preparare le piastre o le provette (v. **PROCEDURA – Preparazione dei reagenti**). Dopo la solidificazione, non liquefare ulteriormente il terreno.

## CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Terreno non arricchito - Preparare le piastre o le provette utilizzando il terreno parzialmente completo (v. **PROCEDURA – Preparazione dei reagenti**) senza aggiungere alcun supplemento, come il sangue. Incubare le piastre o le provette con i ceppi per test indicati nella tabella sottostante. Per ulteriori informazioni, v. **ISTRUZIONI GENERALI PER L'USO**. Incubare i batteri in aerobiosi a 35 ± 2 °C per 18 – 48 h. Incubare *Aspergillus niger* in aerobiosi a 25 – 28 °C per 3 – 4 giorni. Secondo la farmacopea statunitense e quella europea, il terreno deve essere incubato a 30 – 35 °C.<sup>1,2</sup>

Ceppi	Risultati
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Crescita
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Crescita
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crescita
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Crescita
Non inoculate	Da appena ambrati a color ambra, lievemente opalescenti

Terreno arricchito con 5% di sangue defibrinato di montone - Preparare le piastre utilizzando terreno parzialmente completo (v. **PROCEDURA – Preparazione dei reagenti**) e aggiungere 5% di sangue di montone, dopo aver raffreddato a 48 – 50 °C. Si consiglia di analizzare il terreno arricchito secondo lo standard M22-A2 NCCLS.<sup>11</sup> Incubare i ceppi per 20 – 24 h in atmosfera aerobica arricchita con anidride carbonica.

Ceppi	Risultati
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Crescita, beta-emolisi
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Crescita, alfa-emolisi
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crescita, eventualmente con beta-emolisi
Non inoculate	Rosso (color sangue)

## PROCEDURA

### Materiali forniti

**BD Tryptic Soy Agar** (terreni in flacone parzialmente completi). Per i volumi di riempimento e le dimensioni delle confezioni, v. **DISPONIBILITÀ**.

**STERILE** 

### Materiali non forniti

Autoclave (regolata a 100 ± 2° C), pentola a vapore o piastra calda; bagnomaria (48 - 50°C); sangue defibrinato (solo per piastre con sangue); contenitori in vetro sterili e capsule di Petri o provette in plastica sterili.

Ulteriori reagenti e apparecchiature di laboratorio eventualmente occorrenti.

### Preparazione dei reagenti

Liquefare **BD Tryptic Soy Agar** (terreni in flacone) riscaldando in autoclave o pentola a vapore. In alternativa, il flacone può essere posto in un contenitore contenente acqua, collocato su una piastra calda e riscaldato fino ad ebollizione. **Prima di riscaldare, svitare leggermente il tappo per regolare la pressione.**

**Avvertenza - Si sconsiglia di usare il forno a microonde per liquefare il terreno. Non introdurre flaconi con chiusure in metallo nel forno a microonde.**

Se si adopera l'autoclave, regolare la temperatura a non più di 100 ± 2° C, in quanto il calore eccessivo può deteriorare gli ingredienti e compromettere le prestazioni microbiologiche. Se si

usa una piastra calda e/o a un sistema a bagnomaria, bollire per un tempo sufficiente a disciogliere tutto il terreno. Il tempo necessario per liquefare completamente il terreno può variare considerevolmente in base alla temperatura effettiva del dispositivo di riscaldamento prima dell'uso, la sua potenza elettrica, le dimensioni, il volume e la temperatura del terreno nel contenitore. Si consiglia di provare e registrare il tempo necessario per la liquefazione dopo il primo impiego.

Una volta liquefatto il terreno, rimuovere il contenitore dal dispositivo di riscaldamento e metterlo nel bagnomaria a 48 – 50 °C.

**Avvertenza - Indossare guanti ignifughi. Non porre il contenitore ancora caldo nel ghiaccio o in acqua fredda per accelerarne il raffreddamento in quanto si potrebbe incrinare il vetro. Pericolo di ustioni.**

Lasciare il contenitore a bagnomaria abbastanza a lungo per consentire il raffreddamento di tutto il terreno alla temperatura prestabilita.

Se si aggiunge sangue defibrinato (ad es. 5% di sangue di montone) o altri supplementi sensibili al calore (che devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso), la temperatura del terreno non deve superare i 50 °C. Durante l'aggiunta del supplemento e la preparazione delle piastre operare in condizioni asettiche. Utilizzare piastre o provette sterili. Miscelare delicatamente il terreno dopo aver aggiunto il supplemento, evitando la formazione di schiuma e bolle.

Versare il terreno nelle piastre se si desidera l'inoculazione superficiale. Per una piastra normale da 90 – 100 mm, è adatto un volume di 19 – 21 mL. Lasciare solidificare il terreno completo, capovolgere le piastre e lasciarle essiccare a temperatura ambiente per un periodo di tempo adeguato (per solidificare completamente, conservare per una notte a 18 – 23 °C). Avvolgere in buste di plastica e conservare a 2 – 8 °C. Le piastre preparate con questo terreno possono essere utilizzate per 5 – 7 giorni.

Se si applica la tecnica di riempimento della piastra, aggiungere il materiale da analizzare o una sua diluizione nella piastra vuota, ricoprire con il terreno, ruotare la piastra delicatamente per miscelare e lasciare solidificare completamente.

Per la preparazione di slant in provetta, aggiungere alle provette un quantitativo adeguato di terreno liquefatto, raffreddato a 48 – 50 °C, e lasciare solidificare nella posizione inclinata desiderata. Le provette con tappi a vite ben chiusi possono essere utilizzate per 2 – 3 settimane se vengono conservate al buio a temperatura ambiente o a 2 – 8 °C.

Prima dell'uso, le superfici del terreno non devono essere troppo umide.

Liquefare il terreno in flacone solo una volta. Il materiale eventualmente rimasto non deve solidificare né deve essere liquefatto una seconda volta, in quanto il riscaldamento ripetuto danneggia gli ingredienti del terreno e compromette le prestazioni microbiologiche.

### **Tipi di campioni**

Il terreno non arricchito versato nelle capsule di Petri viene utilizzato per varie procedure, ad es. nei test farmacologici. In microbiologia clinica, non usare il terreno per l'isolamento primario di patogeni da campioni clinici se non con l'aggiunta di sangue (ad es. 5% di sangue di montone). Aggiungendo 5% di sangue, il terreno su piastra può essere usato universalmente per l'isolamento primario dei patogeni da qualsiasi campione. Per informazioni sul prelievo e il trattamento dei campioni, consultare la bibliografia.<sup>4,10</sup> Non usare lo slant in provetta direttamente con campioni clinici ma solo per la crescita e la conservazione delle colture batteriche.

### **Procedura del test**

Prima dell'uso, le superfici dell'agar del terreno completo (nelle capsule di Petri o nelle provette) devono essere lisce e umide; evitare tuttavia che si crei eccessiva umidità perché potrebbe far confluire la crescita.

Per le tecniche più adatte, consultare la bibliografia.<sup>2,6,7</sup>

Piastre con aggiunta di sangue - strisciare il campione non appena perviene in laboratorio. La piastra strisciata è usata prevalentemente per isolare colture pure da campioni contenenti flora mista. In alternativa, se il materiale viene posto in coltura direttamente da un tampone, passare il

tampone su una piccola area della superficie del bordo e strisciare da questa area inoculata. Incubare le piastre o le provette nelle condizioni prescelte.

- Per i campioni clinici, incubare 18 – 48 h (o più a lungo, se necessario) a  $35 \pm 2$  °C, o come previsto per gli organismi.
- Per le analisi igieniche, incubare a 30 – 35 °C fino a 5 giorni.

Per le analisi dei campioni farmacologici, consultare la bibliografia.<sup>1,2</sup>

Lo slant in provetta viene usato per la coltura e la conservazione delle colture batteriche. Strisciare il ceppo direttamente, o previa sospensione in acqua sterile o soluzione fisiologica, sull'intera superficie dello slant. Incubare l'isolato secondo la procedura appropriata. Durante l'incubazione, allentare leggermente i tappi per aerare. Dopo l'incubazione e durante la conservazione, chiudere completamente i tappi.

### Risultati

Dopo l'incubazione, le piastre possono evidenziare un'area di crescita confluyente. Poiché la procedura di striscio è in effetti una tecnica di "diluizione", nelle aree strisciate si deposita un numero decrescente di microrganismi. Pertanto, una o più di queste aree presenteranno colonie isolate degli organismi contenuti nel campione. La crescita di ogni organismo, inoltre, può essere misurata in maniera semiquantitativa valutando la crescita nelle singole aree strisciate.

- Tecnica di allestimento della piastra - Consultare le relative voci della bibliografia.<sup>1,2,6,7</sup>

Gli slant, se vengono insemiati con un inoculo adatto, mostrano la crescita su tutta la superficie. Le provette possono essere conservate in frigorifero per diverse settimane senza alcuna perdita di vitalità della coltura. Il tempo di sopravvivenza dipende dai singoli ceppi.

Sui terreni completi ricavati da **BD Tryptic Soy Agar** (terreni in flacone) crescono numerosi e differenti tipi di organismi; quindi, il loro aspetto non viene preso in esame in questa sede. Consultare la bibliografia.<sup>4,9,10</sup>

Eeguire le subcolture adatte agli isolati ottenuti sui terreni per differenziarli e identificarli ulteriormente.

### PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

**BD Tryptic Soy Agar** viene utilizzato in varie tecniche di microbiologia industriale, ad es. per i test sui limiti microbici e le analisi microbiologiche su risorse idriche e alimenti.<sup>1-3,6,7</sup>

Tryptic Soy Agar non arricchito è utilizzato per la coltura di numerosi batteri meno esigenti, ad es. *Enterobacteriaceae*, Gram-negativi non fermentanti (*Pseudomonas* e molti altri), enterococchi, stafilococchi, batteri sporigeni (*Bacillus* e generi correlati) e altri organismi con simili esigenze per la crescita. Il terreno non è adatto per l'isolamento e la coltura di batteri molto esigenti, ad es. *Neisseria* o *Haemophilus* spp., o altri organismi con particolari esigenze nutritive, e non è ideale per l'isolamento di anaerobi stretti esigenti. Il suo impiego in microbiologia clinica, pertanto, è limitato a determinati test, ad es. per la differenziazione di *Haemophilus* con strisce di fattori X, V e XV.<sup>8</sup>

Tryptic Soy Agar con aggiunta di sangue (ad es. 5% di sangue di montone) viene spesso usato per l'isolamento primario di batteri aerobi in microbiologia clinica. Per ulteriori informazioni, consultare la bibliografia.<sup>3-5,8-10</sup>

Tryptic Soy Agar senza supplementi non contiene alcun composto che neutralizzi attivamente disinfettanti o conservanti. Se si analizzano campioni contenenti tali composti o superfici precedentemente disinfettate, usare Tryptic Soy Agar con lecitina e polisorbato o integrare il terreno in maniera adeguata.

### BIBLIOGRAFIA

1. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 1994. The U.S. Pharmacopeia 24/The national formulary 19-1999. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
2. Council of Europe, 2002. European Pharmacopoeia, 4th edition, and Supplement 4.2. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.

3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
4. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
5. Nash, P., and M.M. Krenz. 1991. Culture media. In: A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Eaton, A.D., L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg (ed.). 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
7. Downes, F.P., and K. Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
8. Campos, J.M. 1995. Haemophilus. In: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. NCCLS M2-A7. 1996. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media - 2nd edition; approved standard. National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Wayne, PA, USA.

## CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

**BD Tryptic Soy Agar** (terreni in flacone parzialmente completi)

N. di cat. 256665	10 flacone	volume di riempimento 100 mL, in flacone per sciroppo da 250 mL
N. di cat. 257105	12 flacone	volume di riempimento 250 mL, in flacone piatto da 500 mL
N. di cat. 257106	10 flacone	volume di riempimento 500 mL, in flacone per sciroppo da 500 mL
N. di cat. 257240	4 flacone	volume di riempimento 400 mL, in flacone per laboratorio da 500 mL

## ULTERIORI INFORMAZIONI

Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante BD di zona.



BD Diagnostic Systems  
 Tullastrasse 8 – 12  
 D-69126 Heidelberg/Germany  
 Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16  
 Reception\_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe  
 Becton Dickinson France SA  
 11 rue Aristide Bergès  
 38800 Le Pont de Claix/France  
 Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 <http://www.bd.com>

BD and BD logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company.  
 Bacto is a trademark of Difco Laboratories, division of Becton, Dickinson and Company.  
 ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.  
 © 2003 Becton, Dickinson and Company