BD Fluid Thioglycollate Medium (FTM)

USO PREVISTO

BD Fluid Thioglycollate Medium (terreno tioglicollato fluido) è un terreno di arricchimento liquido universale utilizzato per le procedure qualitative dei test di sterilità e per l'isolamento e la coltura di aerobi, anaerobi e microaerofili che non siano particolarmente esigenti. Il terreno può essere utilizzato in microbiologia clinica come arricchimento per i campioni clinici.

PRINCIPI E SPIEGAZIONE DELLA PROCEDURA

Metodo microbiologico.
Il terreno tioglicollato fluido è stato allestito da Brewer per la coltura rapida di anaerobi e aerobi.[1]
Il peptone di caseina è stato aggiunto da Vera nel 1944.[2]
Il terreno sostiene un buon livello di crescita per numerosi organismi, inclusi gli anaerobi stretti, senza incubazione in atmosfera anaerobica. Il tioglicollato di sodio, oltre a ridurre il potenziale di ossidoriduzione, è in grado di neutralizzare l'attività antibatterica dei composti del mercurio. Queste caratteristiche rendono l'FTM particolarmente utile per stabilire la presenza di contaminanti nei materiali biologici e di altro tipo. Questa formula, grazie alla sua capacità di stimolare la crescita, è stata adottata dalla farmacopea statunitense (USP), dall'AOAC e dalla farmacopea europea (EP) per i test di sterilità e come terreno di arricchimento.[3-6] Il terreno tioglicollato fluido è ampiamente usato in microbiologia clinica anche come arricchimento, in particolare per i campioni prelevati da siti corporei normalmente sterili.[7]
BD Fluid Thioglycollate Medium, avendo un basso potenziale di ossidoriduzione, non è il terreno di scelta per gli aerobi stretti, ad es. non fermentanti, *Micrococcus* e organismi simili. Per questi organismi, utilizzare Tryptic Soy Broth o brodo di infuso cuore-cervello.

BD Fluid Thioglycollate Medium contiene glucosio, peptone ed estratto di lievito, che forniscono i fattori necessari per la crescita batterica. Tioglicollato di sodio e L-cistina sono agenti riducenti che impediscono l'accumulo di perossidi, che risultano letali per alcuni microrganismi. La resazurina è un indicatore di ossidoriduzione che vira al rosa se viene ossidata, mentre appare incolore se viene ridotta. Il piccolo quantitativo di agar contribuisce a tenere basso il potenziale di ossidoriduzione, stabilizzando il terreno rispetto alle correnti di convezione, per mantenere l'anaerobiosi negli strati più profondi del terreno.[8] Spesso il terreno tioglicollato fluido appare lievemente opaco per il suo contenuto di agar.
Durante l'allestimento, questo terreno pronto all'uso viene sottoposto a un getto di azoto, che scolora l'indicatore resazurina. Il terreno, tuttavia, può essere utilizzato finché non viene ossidato per circa il 30% (strato superiore), come indicato dalla colorazione rosa della resazurina in prossimità della superficie. Se l'ossidazione ha superato tale livello, il brodo può essere riscaldato una volta a vapore o in acqua bollente, raffreddato e utilizzato.
La farmacopea statunitense permette la presenza di acqua nel glucosio (destrosio) e quindi include 5,5 grammi nella formula.[3] Poiché la presenza di umidità è nociva per il terreno disidratato, viene aggiunto un quantitativo equivalente di glucosio in forma anidra.

REAGENTI

BD Fluid Thioglycollate Medium (FTM)

Formula* per litro di acqua purificata

Estratto di lievito	5,0 g	Cloruro di sodio	2,5 g
Digerito pancreatico di caseina	15,0	Tioglicollato di sodio	0,5
Glucosio (anidro)	5,0	Resazurina	0,001
L-cistina	0,5	Agar	0,75

pH 7,1 ±0,2
*Compensata e/o corretta per soddisfare i criteri di rendimento.

PRECAUZIONI

IVD . Solo per uso professionale.
Non usare le fiale che presentino tracce di contaminazione microbica, alterazione cromatica, essiccamento, fissurazioni o altri segni di deterioramento.
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 le fiale al buio a 2 – 8 °C fino a immediatamente prima dell'uso. Evitare congelamento e surriscaldamento. Le fiale possono essere inoculate fino alla data di scadenza (v. il contenitore o l'etichetta sulla confezione) e incubate per il tempo necessario. Le fiale prelevate dalle confezioni già aperte possono essere usate fino alla data di scadenza. Le fiale aperte devono essere utilizzate immediatamente.

CONTROLLO DI QUALITÀ A CURA DELL'UTENTE

Analizzare i campioni con gli organismi indicati nella tabella sottostante. Per osservare i requisiti della farmacopea statunitense ed europea, utilizzare un inoculo di 10 – 100 UFC per contenitore.[3-5] Secondo la farmacopea europea, incubare i contenitori inoculati a 30 – 35 °C per non più di 3 giorni con aria normale. Per una crescita ottimale degli aerobi stretti, aerare le fiale durante l'incubazione. A tal fine, allentare leggermente i tappi.

Ceppo per test	**Risultati attesi per la crescita (torbidità)***
Staphylococcus aureus ATCC 6538	+++ o superiore
Micrococcus luteus ATCC 9341	++ o superiore
Bacillus subtilis ATCC 6633	++ o superiore
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	+++ o superiore
Clostridium sporogenes ATCC 19404	+++ o superiore
Clostridium sporogenes ATCC 11437	+++ o superiore
Bacteroides vulgatus ATCC 8482	+++ o superiore
Non inoculate	Da chiara a lievemente opalescente, color ambra chiaro, strato superiore eventualmente rosa

* ++++ = opaca, marcata +++ = opalescente, marcata ++ = opalescente + = lieve alone

PROCEDURA

Materiali forniti

BD Fluid Thioglycollate Medium, fornito in fiale (per ulteriori informazioni, v. **CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ).**

STERILE

Materiali non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Tipi di campioni

BD Fluid Thioglycollate Medium può essere usato come terreno di arricchimento con tutti i tipi di campioni clinici e non clinici. Inoculare i terreni di arricchimento solo se i campioni provengono da siti corporei normalmente sterili. Emina e vitamina K1 sono necessarie per migliorare la crescita di alcuni anaerobi stretti. Se si sospetta la presenza di tali organismi, il terreno può essere arricchito con 10 mg di cloridrato di emina e 1 mg di vitamina K1 (manadione) per litro.

Procedura del test

BD Fluid Thioglycollate Medium può essere usato senza ricorrere a ulteriori procedure di pretrattamento. Se più del 30% del terreno viene ossidato prima dell'uso (come si evince dalla colorazione rosa dell'indicatore resazurina), il terreno può essere riscaldato una volta a vapore o in acqua bollente per 5 min, con il tappo lievemente allentato, quindi viene raffreddato e utilizzato. Poiché il terreno è allestito sotto un getto di azoto, l'aerazione dei contenitori durante l'incubazione migliora la crescita dei batteri aerobi stretti. A tal fine allentare leggermente i tappi.

Per essere usato in microbiologia clinica, il terreno viene arricchito con 10 mg di cloridrato di emina per litro (preparare una stock-soluzione diluita dieci volte in 0,1 N di NaOH, sterilizzare mediante filtrazione e aggiungere alla fiala il quantitativo richiesto) e con 1 mg di vitamina K1 per litro (preparare una stock-soluzione diluita dieci volte in etanolo puro, sterilizzare mediante filtrazione e aggiungere alla fiala il quantitativo richiesto). Le stock-soluzioni di emina e vitamina K possono essere conservate in frigorifero, al buio, per 4 settimane. L'arricchimento non è necessario se nella fiala viene inoculato un quantitativo sufficiente di sangue o siero prelevati dal campione. Inoculare i campioni direttamente nel terreno e incubare le provette per non più di 7 giorni a 35 ± 2 °C. I campioni, inoltre, devono essere inoculati direttamente su terreni solidi, come **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** o **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood**, e su altri terreni selettivi e non selettivi. Utilizzare **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood** per l'isolamento e la coltura degli anaerobi stretti. Poiché **BD Fluid Thioglycollate Medium** non è adatto per l'arricchimento di alcuni aerobi stretti, si può utilizzare il campione per inoculare anche un secondo terreno di arricchimento liquido, ad es. il brodo di infuso cuore e cervello.
Per i test di sterilità, attenersi alle raccomandazioni della farmacopea statunitense ed europea e alle indicazioni di altri enti di controllo.[3-6] Queste fonti di riferimento precisano il rapporto tra terreno e prodotto da rispettare nei test di sterilità, oltre a fornire informazioni dettagliate sui prelievi e l'interpretazione dei risultati dei test. Se il campione da testare rende il terreno così torbido da impedire un facile riconoscimento della crescita microbica, trasferire su un altro terreno.

Risultati
Dopo l'incubazione, la crescita è indicata dalla comparsa di torbidità nelle provette. Nei casi dubbi, eseguire le subcolture dei campioni idonei nei terreni su piastra. Attenersi a questa procedura anche per le ulteriori indagini sugli organismi isolati. Se vengono aerati prima o durante l'incubazione, gli anaerobi obbligati crescono soltanto nella porzione di brodo sotto lo strato superiore ossidato (rosa).
Per isolare i patogeni dai campioni clinici, eseguire le subcolture trasferendo 10 – 50 µL di terreno incubato su **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** o **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood** per gli aerobi, e su **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood** o **BD CDC Anaerobe Agar with 5% sheep blood** per gli anaerobi stretti. Predisporre le condizioni atmosferiche più appropriate per queste subcolture.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE E LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA
BD Fluid Thioglycollate Medium viene utilizzato come terreno di arricchimento in numerose procedure cliniche e non cliniche.[3-5,7,8] Essendo fortemente riducente, il terreno crea le condizioni di anaerobiosi senza necessità di incubare in atmosfera anaerobica. Per un isolamento ottimale degli anaerobi esigenti, ad es. *Prevotella* spp., integrare il terreno con emina e vitamina K1 (v. **Procedura del test**).

Benché numerosi aerobi obbligati (ad es. *Micrococcus*, *Pseudomonas* e generi correlati e bacilli sporigeni aerobi stretti) possano crescere su questo terreno se le fiale vengono aerate durante l'incubazione (in genere la crescita appare come una sottile pellicola in prossimità della superficie), il terreno tioglicollato fluido non è un terreno ottimale per l'isolamento degli aerobi stretti. Per questi organismi, utilizzare Tryptic Soy Broth o brodo di infuso cuore-cervello.

Non riscaldare il terreno tioglicollato fluido più di una volta, in quanto il calore potrebbe compromettere le prestazioni microbiologiche del terreno.

Eseguire le subcolture del terreno trasferendo la crescita su terreni solidi adatti per ottenere colture pure identificabili con le tecniche specifiche per gli isolati.

BIBLIOGRAFIA

1. Brewer, J.H. 1940. Clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobes. J. Am. Med. Assoc. 115:598-600.
2. Vera, H.D. 1944. A comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. J. Bacteriol. 47:59-70.

3. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 1999. The U.S. Pharmacopeia 24/The national formulary 19--2000. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md
4. Council of Europe, 1996. European Pharmacopoeia, 3rd edition. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
5. Council of Europe, 2000. European Pharmacopoeia, Supplement 2001. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
6. Cunniff, P. (ed.). 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.
7. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.

CONFEZIONE/DISPONIBILITÀ

BD Fluid Thioglycollate Medium: Terreno in flacone pronto all'uso
N. di cat. 257144 cpu 50; 20 mL in fiale da 30 mL con tappo a vite

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.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
© 2003 Becton, Dickinson and Company