



**Thioglycollate Medium,
Enriched with Vitamin K₁ and Hemin
L007509 • Rev. 14 • ottobre 2015**



PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ (Facoltativo)

I INTRODUZIONE

Thioglycollate Medium, arricchito con Vitamina K₁ ed Emina è un supporto generico per la coltivazione di microrganismi esigenti e non esigenti.

II PROCEDURA DEL TEST

1. Ridurre le provette del supporto bollendo* con i tappi non completamente avvitati. Dopo la bollitura, serrare immediatamente i tappi e far raffreddare le provette a temperatura ambiente.
***NOTA:** Si sconsiglia l'uso del forno a microonde.
2. Preparazione degli inoculi
Utilizzare una coltura di 48 – 72 h di Enriched Thioglycollate Medium, Chopped Meat Medium, o colonie da una piastra di Agar di CDC Anaerobio con il 5% di sangue ovino trasferita in una provetta pre-ridotta di Enriched Thioglycollate Medium, e regolare a torbidità paragonabile allo standard McFarland 0,5.
3. Servendosi di un'ansa calibrata sterile da 0,01 mL, inoculare nelle provette l'inoculo standard di ogni organismo.
4. Incubare le provette (con i tappi completamente avvitati) a 35 ± 2 °C in atmosfera aerobica.
5. Esaminare la crescita nelle provette dopo 18 – 24 h e 42 – 48 h.
6. Risultati attesi

Organismi di controllo CLSI (Ceppi ATCC)

Peptostreptococcus anaerobius Crescita
(27337)

**Bacteroides vulgatus* Crescita
(8482)

**Clostridium perfringens*..... Crescita
(13124)

Ceppi supplementari utilizzati:

Porphyromonas levii Crescita
(29147)

Clostridium novyi A..... Crescita
ATCC 7659

*Ceppo batterico raccomandato per il controllo di qualità a cura dell'utente.

III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE

1. Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
2. Eseguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
3. Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di $7,0 \pm 0,2$.
4. Incubare a 20 – 25 °C e a 30 – 35 °C le provette rappresentative non inoculate ed esaminarle dopo 7 giorni per verificare la contaminazione microbica.

INFORMAZIONI SUL PRODOTTO

IV USO PREVISTO

Thioglycollate Medium, arricchito con Vitamina K₁ ed Emina è un supporto generico utilizzato in procedure qualitative per la coltivazione di microrganismi esigenti e non esigenti, tra cui batteri aerobi ed anaerobi, da una varietà di materiali clinici e non clinici.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Enriched Thioglycollate Medium è **BBL** Thioglycollate Medium privo dell'Indicator-135C fornito con vitamina K₁ ed emina.¹⁻³ Il supporto su brodo arricchito è consigliabile per l'uso nell'isolamento e nella coltivazione di microrganismi esigenti o a crescita lenta, necessariamente anaerobi presenti nei materiali clinici.^{4,5} Inoltre, è consigliabile per l'isolamento e la coltivazione di un'ampia varietà di microrganismi aerobi e facoltativamente anaerobi. Il supporto è preparato in atmosfera anaerobica e viene introdotto in provette con tappo a vite secondo le prescrizioni del CDC.⁴ La vitamina K₁ e l'emina hanno dimostrato di essere indispensabili per alcuni anaerobi.^{6,7}

L'isolamento di microrganismi da materiali clinici spesso richiede l'impiego di supporti su brodo arricchito da aggiungere ai supporti su piastra selettivi, differenziali e non selettivi normalmente utilizzati per l'isolamento primario. L'utilizzo di supporti liquidi di "back up" riduce la possibilità di perdere completamente un agente eziologico presente in scarsa quantità, a crescita lenta su supporti su piastra, suscettibile ad agenti selettivi o sensibile a sfavorevoli condizioni di incubazione; per esempio, anaerobiosi insufficiente per la crescita ottimale di anaerobi obbligati.

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Il tioglicolato di sodio, come agente riducente, mantiene una bassa tensione dell'ossigeno nel supporto. La vitamina K₁ è un requisito di crescita di alcuni ceppi di *Prevotella melaninogenica*⁶ e favorisce la crescita di alcuni ceppi di specie batteroidi non sporulatori gram-positivi.⁸ L'emina è la fonte del fattore X che stimola la crescita di diversi microrganismi.

VII REAGENTI

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Formola approssimata* per L di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina	17,0	g
Digerito papaico di farina di soia	3,0	g
Destrosio	6,0	g
Cloruro di sodio	2,5	g
Tioglicollato di sodio	0,5	g
Agar	0,7	g
L-cistina	0,25	g
Solfito di sodio	0,1	g
Emina	0,005	g
Vitamina K ₁	0,001	g

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

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Prestare cautela nel refertare i risultati della colorazione di Gram e/o altri risultati di colorazione microbiologica diretta su campioni di tessuto trattati con questo terreno, in quanto è possibile la presenza di organismi non vitali nel terreno di coltura.

Aprire con estrema cautela le provette con i tappi serrati allo scopo di evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'Istituto e alle "Precauzioni standard".⁹⁻¹² Dopo l'uso, le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati devono essere sterilizzati in autoclave prima dello smaltimento.

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le provette al buio a 2 – 8 °C. Evitare di congelare e surriscaldare. Aprire soltanto al momento dell'uso. Ridurre al minimo l'esposizione alla luce. I terreni in provetta conservati come indicato sull'etichetta sino al momento dell'uso, possono essere inoculati fino alla data di scadenza e incubati per i tempi di incubazione raccomandati. Prima dell'inoculo, attendere che il terreno si porti a temperatura ambiente.

Deterioramento del prodotto

Non usare le provette se presentano tracce di contaminazione microbica, alterazione di colore, essiccamento o altri segni di deterioramento.

VIII RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I campioni idonei per coltura possono essere manipolati con varie tecniche. Per informazioni specifiche, consultare i testi opportuni.^{13,14} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Materiali necessari ma non forniti

Terreni di coltura accessori, reagenti, microrganismi per controllo di qualità e apparecchiature di laboratorio necessarie.

Procedura del test

Adottare tecniche asettiche.

I supporti liquidi per l'incubazione anaerobica devono essere ridotti prima dell'inoculazione posizionando le provette (con i tappi non completamente avvitati), in condizioni anaerobiche per 18 – 24 h prima dell'uso. Un modo facile ed efficace per creare condizioni anaerobiche è l'utilizzo del sistema anaerobico **BBL GasPak EZ**. In alternativa, i supporti liquidi possono essere ridotti immediatamente prima dell'uso, per bollitura*, con i tappi non completamente avvitati, e successivo raffreddamento, con i tappi completamente serrati, a temperatura ambiente prima dell'inoculazione.

Inoculare il campione nei supporti selezionati subito dopo il suo arrivo in laboratorio. Con campioni liquidi, i supporti in provetta devono essere inoculati con una o più gocce di campione. Triturare i campioni di tessuto destinati alla coltura di organismi, poi omogeneizzarli in brodo sterile ridotto, come per esempio Enriched Thioglycollate Medium. L'inoculazione viene quindi eseguita come per i campioni liquidi. I campioni su tampone possono essere inseriti nel brodo dopo l'inoculazione dei supporti su piastra. In alternativa, è possibile "strofinare" il campione in una piccola quantità di brodo ridotto sterile come Enriched Thioglycollate Medium ed il brodo utilizzato per l'inoculazione dei supporti come per i campioni liquidi.

I campioni noti o sospetti di contenere anaerobi obbligati devono essere inoculati in prossimità del fondo della provetta. Incubare le provette con i tappi serrati aerobicamente a 35 ± 2 °C o ad altre temperature opportune.

Le colture di brodo devono essere conservate almeno 1 settimana prima di essere eliminate perché negative.¹⁵

***NOTA:** Si sconsiglia l'uso del forno a microonde.

Controllo di qualità a cura dell'utente

Vedere "Procedure di controllo di qualità".

Ciascun lotto di terreno è stato testato utilizzando organismi per il controllo di qualità appropriati, e tali test soddisfano le specifiche di prodotto e gli standard CLSI, ove opportuno. Come di consueto, i test di controllo qualità devono essere eseguiti in ottemperanza alle normative locali, statali, federali o nazionali vigenti, nonché ai requisiti di certificazione e/o alle procedure standard di controllo di qualità del laboratorio specifico.

Per determinare fotometricamente il pH dei terreni in provetta, usare un singolo elettrodo di dimensioni sufficientemente ridotte da permetterne l'inserimento nelle provette. Posizionare la punta dell'elettrodo al di sotto della superficie del brodo.

X RISULTATI

La crescita in provette di brodo, come Enriched Thioglycollate Medium, viene evidenziata dall'aspetto torbido in confronto ad un controllo non inoculato.

Se viene rilevata una crescita, le colture devono essere esaminate tramite colorazione di Gram e subcoltivate su supporti su piastra selettivi e non selettivi. In caso di sospetta presenza di anaerobi, le subcolture devono inoltre essere realizzate su opportuni supporti su piastra per anaerobi.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Gli anaerobi possono essere invasi da organismi facoltativi a crescita più rapida. Esaminare ed eseguire la colorazione di Gram se il supporto su piastra non evidenzia alcuna crescita. Non è possibile basarsi sulle colture in brodo destinate esclusivamente all'isolamento di anaerobi. Alcuni anaerobi possono essere inibiti da prodotti metabolici o acidi prodotti da anaerobi facoltativi a crescita più rapida.¹⁵

Ai fini dell'identificazione, i microrganismi devono essere in coltura pura. Per l'identificazione finale, è necessario eseguire test morfologici, biochimici e/o sierologici. Per informazioni dettagliate e procedure raccomandate, consultare la documentazione appropriata.^{13,14,16}

I terreni di coltura contengono talvolta microrganismi morti derivati dai componenti del terreno, che possono essere visibili negli strisci da terreni di coltura. Altre fonti di microrganismi morti visibili alla colorazione di Gram includono reagenti di colorazione, olio di immersione, vetrini e gli stessi campioni usati per l'inoculo. In caso di incertezza sulla validità della colorazione di Gram, reincubare la coltura per un'altra ora o due e ripetere il test prima di eseguire il referto.

XII PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin. Prima dell'inoculazione, campioni rappresentativi del lotto vengono ridotti tramite bollitura a bagnomaria per almeno 10 minuti e successivamente raffreddati. Servendosi di un'ansa calibrata da 0,01 mL, le provette vengono inoculate con colture regolate allo standard di torbidità McFarland 0,5. Gli inoculi per *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) e *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) vengono preparati da colonie cresciute su piastre Agar CDC Anaerobio con il 5% di sangue ovino e regolate alla corretta concentrazione di inoculo nel Thioglycollate Medium, Enriched pre-ridotto. L'inoculo per *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) viene prelevato da Thioglycollate Medium, Enriched e l'inoculo per *C. novyi* A (ATCC 7659) viene prelevato da Chopped Meat Glucose Broth, PR II. Le provette vengono inoculate sotto la superficie dei brodi scendendo il più possibile in profondità nel supporto. I tappi vengono serrati immediatamente dopo l'inoculazione e le provette vengono incubate anaerobicamente a 35 ± 2 °C. I risultati dell'aliquota di crescita nelle provette vengono letti dopo 18 – 24 h e 42 – 48 h. Tutti gli organismi evidenziano una crescita da appena visibile a sostenuta dopo 48 h.

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
221742	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 5 mL
221787	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 mL
221788	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 mL
297292	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 10 mL

XIV BIBLIOGRAFIA

1. Brewer, J.H. 1940. A clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobes. *J. Bacteriol.* 39:10.
2. Vera, H.D. 1944. Comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. *J. Bacteriol.* 47:59-65.
3. Dowell, V.R., Jr., and T.M. Hawkins. 1987. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC laboratory manual. HHS Publication No. (CDC) 87-8272. Centers for Disease Control, Atlanta.
4. Dowell, V.R., Jr., G.L. Lombard, F.S. Thompson, and A.Y. Armfield. 1977. Media for isolation, characterization, and identification of obligately anaerobic bacteria. CDC laboratory manual. Center for Disease Control, Atlanta.
5. Forbes, B.A., and P.A. Granato. 1995. Processing specimens for bacteria, p. 265-281. *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.
6. Gibbons, R.J. and J.B. MacDonald. 1960. Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.* 80:164-170.
7. Wilkins, T.D., S.L. Chalgren, F. Jimenez-Ulate, C.R. Drake, Jr., and J.L. Johnson. 1976. Inhibition of *Bacteroides fragilis* on blood agar plates and reversal of inhibition by added hemin. *J. Clin. Microbiol.* 3:359-363.
8. Finegold, S.M., V.L. Sutter, H.R. Attebery, and J.E. Rosenblatt. 1974. Isolation of anaerobic bacteria, p. 365-375. *In* E.H. Lennette, G.H. Spaulding, and J.P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
10. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
11. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
12. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). *Official Journal L262*, 17/10/2000, p. 0021-0045.
13. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller (ed.). 2007. *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
15. Reischelderfer, C., and J.I. Mangels. 1994. Culture media for anaerobes, p. 2.3.1-2.3.8. *In* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
16. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD o visitare il sito www.bd.com/ds.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD