



# BBL Thioglycollate Medium, Enriched (with Vitamin K<sub>1</sub> and Hemin), with Calcium Carbonate



L007510 • Rev. 05 • Gennaio 2011

## PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ

### I INTRODUZIONE

**BBL Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate** è un terreno universale per la coltivazione di microrganismi esigenti e non esigenti e per la conservazione di colture stock.

### II PROCEDURA DEL TEST

1. Ridurre le provette di terreno mediante ebollizione\*, con i tappi non completamente avvitati. Dopo l'ebollizione, avvitare immediatamente i tappi e lasciare raffreddare le provette a temperatura ambiente.
2. Preparazione degli inoculi  
Usare una coltura di 48 – 72 h di Enriched Thioglycollate Medium, Chopped Meat Medium o colonie da una piastra CDC agar sangue di montone al 5% per anaerobi trasferite in una provetta pre-ridotta di Enriched Thioglycollate Medium e correggere a una torbidità comparabile a uno standard McFarland 0,5.
3. Con l'ausilio di un'ansa calibrata sterile da 0,01 mL, inoculare le provette con l'inoculo standardizzato per ogni microrganismo.
4. Incubare le provette – con i tappi completamente avvitati – a  $35 \pm 2$  °C in aerobiosi.
5. Esaminare le provette dopo 18 – 24 e 42 – 48 h per verificare la crescita.
6. Risultati attesi

\**Peptostreptococcus anaerobius*.....Crescita  
ATCC 27337

\**Bacteroides vulgatus* .....Crescita  
ATCC 8482

\**Clostridium perfringens* .....Crescita  
ATCC 13124

*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

**BBL Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate** è un terreno universale usato in procedure qualitative per la coltivazione di microrganismi esigenti e non esigenti, inclusi batteri aerobi e anaerobi, da svariati materiali clinici e non clinici. È raccomandato anche per la conservazione di colture stock.

### V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il terreno **BBL Enriched Thioglycollate Medium** è il terreno **BBL Thioglycollate Medium** senza Indicatore-135C, supplementato con vitamina K<sub>1</sub> ed emina.<sup>1-3</sup> L'uso del brodo arricchito è raccomandato nell'isolamento e nella coltivazione di microrganismi anaerobi obbligati a crescita lenta o esigenti presenti nei materiali clinici<sup>4,5</sup> ma anche per l'isolamento e la coltura di un'ampia gamma di microrganismi anaerobi facoltativi e aerobi. Questo terreno è preparato con un'atmosfera in anerobiosi ed è fornito in provette con tappo a

vite in conformità alle raccomandazioni CDC.<sup>4</sup> È stato dimostrato che vitamina K<sub>1</sub> ed emina sono necessarie per la crescita di alcuni anaerobi.<sup>5,7</sup>

Il carbonato di calcio migliora la conservazione delle colture stock neutralizzando gli acidi prodotti durante la crescita.<sup>8</sup>

L'isolamento di microrganismi da materiali clinici richiede spesso l'uso di brodi arricchiti, oltre ai terreni in piastra selettivi, differenziali e non selettivi normalmente usati per l'isolamento primario. L'uso di terreni liquidi di "back up" riduce la possibilità di non rilevare un agente eziologico presente in quantità ridotte, a lenta crescita in terreni in piastra, sensibile ad agenti selettivi o a condizioni di incubazione sfavorevoli, ossia anaerobiosi insufficiente per la crescita ottimale di anaerobi obbligati.

## VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

I peptoni di soia e caseina forniscono aminoacidi e altre sostanze azotate per supportare la crescita batterica. L'estratto di lievito fornisce le vitamine del complesso B. Il cloruro di sodio fornisce gli ioni essenziali. Il destrosio è una fonte di energia.

L'azione riducente esercitata da tioglicollato di sodio e solfito di sodio lega l'ossigeno molecolare, rimuovendolo così dal terreno per mantenere un basso Eh.<sup>9</sup> Viene aggiunta una piccola quantità di agar per ritardare l'assorbimento dell'ossigeno, riducendo le correnti di convezione nel terreno.<sup>9</sup>

La vitamina K<sub>1</sub> è un fattore di crescita essenziale di alcuni ceppi di *Prevotella melaninogenica*<sup>5</sup> e si è dimostrata in grado di migliorare la crescita di alcuni ceppi di *Bacteroides* spp. e microrganismi non sporigeni gram-positivi.<sup>10</sup> L'emina è la fonte di fattore X, che stimola la crescita di numerosi microrganismi esigenti.

L'incorporazione del carbonato di calcio è raccomandata perché, in caso contrario, i microrganismi esigenti possono crescere e quindi morire rapidamente e serve a neutralizzare l'acido prodotto durante la crescita.<sup>8,11</sup>

## VII REAGENTI

### BBL Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate

Formula approssimata\* per L di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina .....	12,0	g
Digerito papaiico di farina di soia .....	3,0	g
Destrosio .....	6,0	g
Estratto di lievito .....	5,0	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 <sub>1</sub> .....	0,001	g
Microsfera di marmo .....	1 per provetta	

\*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".<sup>12-15</sup> 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 congelamento e surriscaldamento. 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 dettagliate, consultare la documentazione appropriata.<sup>16,17</sup> Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

### **IX PROCEDURA**

#### **Materiale fornito**

**BBL Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate**

#### **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 aseptiche.

Il terreno liquido per l'incubazione in anaerobiosi deve essere ridotto prima dell'inoculo ponendo le provette – con i tappi non completamente avvitati – in anaerobiosi per 18 – 24 h prima dell'uso. Un modo semplice ed efficace per ottenere condizioni di anaerobiosi adatte, è l'uso del sistema per anaerobiosi **BD GasPak EZ**. In alternativa, il terreno liquido può essere ridotto immediatamente prima dell'uso bollendo\* le provette con i tappi non completamente avvitati e lasciandole raffreddare con i tappi ben avvitati a temperatura ambiente prima dell'inoculo.

Inoculare il campione nel terreno di scelta non appena perviene in laboratorio. In caso di campioni liquidi, inoculare i terreni in provetta con una o due gocce del campione. Triturare i campioni di tessuto destinati alla coltura di organismi, poi omogeneizzarli in brodo sterile ridotto, come per esempio Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate. Eseguire quindi l'inoculo come per i campioni liquidi. I campioni su tampone possono essere inseriti nel brodo dopo l'inoculo del terreno in piastra. In alternativa, è possibile "strofinare" il tampone in un piccolo volume di brodo sterile ridotto e usare il brodo per inoculare i terreni come nel caso di campioni liquidi.

I campioni di cui si è certi o che si sospetta che contengano anaerobi obbligati, devono essere inoculati in prossimità del fondo della provetta. Incubare le provette – con i tappi completamente avvitati – a  $35 \pm 2$  °C, a altra temperatura appropriata.

Conservare i brodi di coltura per almeno 1 settimana prima di classificarli come negativi e gettarli.<sup>8</sup>

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

#### **Controllo di qualità a cura dell'utente**

Vedere "Procedure di controllo di qualità".

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI in merito.

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 nei terreni di brodo, come per esempio Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate, è indicata dalla comparsa di torbidità rispetto a un controllo non inoculato.

In caso di crescita, le colture devono essere esaminate mediante colorazione di Gram e messe in subcoltura su terreni in piastra selettivi e non selettivi. Qualora si sospetti la presenza di anaerobi, eseguire subcolture in terreni in piastra per anaerobiosi appropriati.

#### XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

La crescita degli anaerobi può essere inferiore a quella di microrganismi (anaerobi) facoltativi a crescita più rapida. Esaminare ed eseguire una colorazione di Gram del brodo se il terreno in piastra non rivela alcuna crescita. Non basarsi mai esclusivamente su colture in brodo per l'isolamento di anaerobi. Alcuni anaerobi possono essere inibiti da prodotti metabolici o acidi prodotti da anaerobi facoltativi a crescita più rapida.<sup>8</sup>

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.<sup>16-18</sup>

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 PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di **BBL** Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate. Prima dell'inoculo, campioni rappresentativi del lotto vengono ridotti mediante ebollizione a bagnomaria per almeno 10 minuti e raffreddati. Con l'ausilio di un'ansa calibrata da 0,01 mL, le provette vengono inoculate con colture corrette a uno standard di torbidità McFarland 0,5. Gli inoculi per *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) e *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) sono preparati da colture cresciute su piastre CDC agar sangue di montone al 5% per anaerobi e corrette alla concentrazione di inoculo appropriata in Enriched Thioglycollate Medium pre-ridotto. L'inoculo per *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) è prelevato da Enriched Thioglycollate Medium mentre l'inoculo per *C. novyi* (ATCC 7659) è prelevato da Chopped Meat Glucose Broth, PR II. Le provette sono inoculate sotto la superficie dei brodi, il più profondamente possibile nel terreno. I tappi vengono perfettamente avvitati subito dopo l'inoculo e le provette incubate in aerobiosi a 35 ± 2 °C. Dopo 18 – 24 h e 42 – 48 h, le provette vengono esaminate per verificare l'entità della crescita. Tutti i microrganismi evidenziano crescita in tracce – intensa dopo 48 h.

#### XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
297264	<b>BBL</b> Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate, cartone da 100 provette di misura K

#### 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*, 6<sup>th</sup> 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. 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.
9. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore.
10. 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.
11. Vera, H.D. 1944. A comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. *J. Bacteriol.* 47:59-70.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12<sup>th</sup> ed. Mosby, Inc., St. Louis.
18. 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.

 Becton, Dickinson and Company  
 7 Loveton Circle  
 Sparks, MD 21152 USA  
 800-638-8663  
[www.bd.com/ds](http://www.bd.com/ds)

 Benex Limited  
 Rineanna House  
 Shannon Free Zone  
 Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BBL and GasPak are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2011 BD