



PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ (Facoltativo)

I INTRODUZIONE

BBL Fluid Thioglycollate Medium (terreno tioglicollato fluido **BBL**) è un terreno universale per la coltivazione di anaerobi, microaerofili e aerobi ed è raccomandato come terreno per i test di sterilità per i prodotti biologici.

II PROCEDURA DEL TEST

1. Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
 - a. Prima dell'uso, svitare parzialmente i tappi e porre le provette in acqua bollente* per circa 5 min finché il terreno non è ridotto (incolore). Avvitare bene i tappi subito dopo la rimozione delle provette dal calore e attendere che il terreno si raffreddi a temperatura ambiente.
***NOTA:** Si sconsiglia l'uso del forno a microonde.
 - b. Da colture di 24 – 48 h di **Trypticase Soy Broth** o **Enriched Thioglycollate Medium** per ceppi di *Bacteroides* e *Clostridium*, preparare una diluizione contenente non più di 100 UFC/mL.
 - c. Usando pipette sterili da 1,0 mL, inoculare le provette con 0,75 mL delle diluizioni.
 - d. Incubare le provette – con i tappi non completamente avvitati – a 30 – 35°C in aerobiosi, a eccezione dei ceppi CLSI (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) che devono essere incubati con i tappi completamente avvitati.
2. Esaminare le provette di ceppi di controllo raccomandati da CLSI (tappi completamente avvitati) dopo 18 – 24 e 48 h per verificare la crescita. Esaminare le provette degli altri ceppi di controllo (raccomandati da USP) per un massimo di 3 giorni per verificare la crescita.
3. Risultati attesi

Microorganismi di controllo CLSI (ceppi ATCC)

**Bacteroides fragilis* Crescita (25285)

**Staphylococcus aureus* Crescita (25923)

Altri ceppi utilizzati:

(test di stimolazione della crescita USP)

***Staphylococcus aureus* Crescita ATCC 6538

***Pseudomonas aeruginosa* Crescita ATCC 9027

***Clostridium sporogenes* Crescita ATCC 11437

***Clostridium sporogenes* Crescita ATCC 19404

***Bacillus subtilis* Crescita ATCC 6633

***Kocuria rhizophila* Crescita ATCC 9341

***Bacteroides vulgatus* Crescita ATCC 8482

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

** Per la verifica della stimolazione della crescita per l'uso in test di sterilità USP.

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 $7,1 \pm 0,2$.
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 Fluid Thioglycollate Medium è conforme alle specifiche della *United States Pharmacopeia (USP)*.

BBL Fluid Thioglycollate Medium (FTM) è usato per test di sterilità di prodotti biologici e per la coltivazione di anaerobi, aerobi e microaerofili.

V SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Il terreno tioglicollato fluido è stato concepito da Brewer per la coltivazione rapida di anaerobi e aerobi¹ e reso inizialmente disponibile, in forma disidratata, da Baltimore Biological Laboratory (BBL) nel 1940. L'incorporazione del peptone di caseina venne introdotta da Vera nel 1944.²

Questo terreno è in grado di supportare una buona crescita di un'ampia gamma di microrganismi esigenti, di specie patogene e non patogene. Il tioglicollato di sodio, oltre a essere in grado di ridurre il potenziale di ossidazione-riduzione, possiede la capacità di neutralizzare l'attività antibatterica dei composti di mercurio. Queste caratteristiche rendono l'FTM particolarmente utile per la determinazione della presenza di contaminazione in materiali biologici e di altro tipo. La formula **BBL** è conforme ai requisiti del test di stimolazione della crescita *USP*.³

Una volta preparato, il terreno Fluid Thioglycollate Medium può essere usato finché la sua ossidazione non raggiunge circa il 30%, come indicato da una colorazione rosa della resazurina in superficie. Se l'ossidazione ha superato tale livello, il brodo può essere riscaldato una volta a vapore o in acqua bollente, raffreddato e utilizzato.

VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Destrosio, peptone, L-cistina ed estratto di lievito forniscono i fattori di crescita necessari per la replicazione batterica. Il cloruro di sodio fornisce gli ioni essenziali. Il tioglicollato di sodio è un agente riducente che previene l'accumulo di perossidi, letali per alcuni microrganismi. La L-cistina è anch'essa un agente riducente, in quanto contiene gruppi solfidrilici che inattivano i composti metallici pesanti e mantengono un basso potenziale redox, supportando così l'anaerobiosi. La resazurina è un indicatore di ossidazione-riduzione, che vira al rosa allorché ossidata ed è incolore allorché ridotta. La piccola quantità di agar facilita la conservazione di un basso potenziale redox stabilizzando il terreno contro correnti di convezione e mantenendo così l'anaerobiosi in profondità nel terreno.⁴ L'*USP* elenca 5,5 g/L di destrosio nella formulazione per il terreno tioglicollato fluido. La formula **BBL** contiene la forma anidra del destrosio (5,0 g/L).

VII REAGENTI

BBL Fluid Thioglycollate Medium

Formula approssimata* per L di acqua purificata

Digerito pancreatico di caseina	15,0	g
L-cistina	0,5	g
Destrosio (anidro)	5,0	g
Estratto di lievito	5,0	g
Cloruro di sodio	2,5	g
Tioglicollato di sodio	0,5	g
Resazurina	0,001	g
Agar	0,75	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 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".⁵⁻⁸ Dopo

l'uso e prima dell'eliminazione, sterilizzare in autoclave le provette preparate, i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

Istruzioni per la conservazione

Al ricevimento, conservare le provette al buio secondo le istruzioni riportate sull'etichetta. 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 la durata raccomandata. 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.^{9,10} Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

IX PROCEDURA

Materiale fornito

BBL Fluid Thioglycollate Medium

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.

Prima dell'uso, svitare parzialmente i tappi e porre le provette in acqua bollente* per circa 5 min finché il terreno non è ridotto (incolore). Avvitare bene i tappi subito dopo la rimozione delle provette dal calore e attendere che il terreno si raffreddi a temperatura ambiente.

Per l'uso generale, inoculare i campioni direttamente nel terreno e incubare le provette per un massimo di 7 giorni a 35 ± 2 °C.

Per i test di sterilità, seguire le raccomandazioni *USP*³ e dei vari organismi di controllo.¹¹ Queste fonti bibliografiche specificano il rapporto di terreno – prodotto da utilizzare nei test di sterilità nonché i dettagli per la raccolta dei campioni e l'interpretazione dei risultati dei test. Ai fini dei test di sterilità, è importante che il terreno nel recipiente per il test sia ridotto in misura sufficiente ad assicurare la replicazione dei microrganismi anaerobi obbligati e microaerofili. Se il campione da testare rende il terreno così torbido da impedire un facile riconoscimento della crescita microbica, trasferire in terreno fresco.

***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

Dopo l'incubazione, la crescita è indicata dalla presenza di torbidità rispetto al controllo non inoculato. I microrganismi strettamente aerobi tendono a crescere in uno strato sottile sulla superficie del brodo, mentre gli anaerobi obbligati crescono soltanto nella porzione di brodo al di sotto dello strato superiore ossidato (rosa). Rimovendo con estrema cautela il liquido da livelli diversi, è possibile migliorare la capacità di separare specie diverse in una coltura mista.

XI LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

La crescita degli anaerobi può essere inferiore a quella di microrganismi 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.¹²

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.

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.^{9,10,13}

XII PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di Fluid Thioglycollate Medium. Prima dell'inoculo, campioni rappresentativi del lotto vengono ridotti mediante ebollizione a bagnomaria per circa 5 min. Una volta raffreddate, le provette sono inoculate con 0,75 mL di colture di *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 e ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e ATCC 25923). Gli inoculi per *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* sono diluiti in modo da contenere non più di 100 Unità Formanti Colonie (UFC) per mL. L'inoculo per *B. vulgatus* è preparato da colonie cresciute su piastre di agar per anaerobi CDC con sangue di montone al 5% e corretto in terreno Tioglicollato senza destrosio e indicatore per ottenere 10 – 100 UFC/mL. I tappi delle provette contenenti *B. fragilis* e *S. aureus* vengono serrati ermeticamente subito dopo l'inoculo mentre quelli di tutte le altre provette non vengono completamente avvitati. Le provette vengono incubate a 35 ± 2 °C. Le provette contenenti *B. fragilis* e *S. aureus* (ATCC 25923) evidenziano crescita in tracce fino a crescita intensa dopo 48 h di incubazione. I rimanenti microrganismi evidenziano crescita da moderata a intensa entro 3 giorni di incubazione.

XIII DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, confezione da 10 provette di misura K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, cartone da 100 provette di misura K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, cartone da 100 provette di misura K (etichetta a getto d'inchiostro)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, confezione da 10 provette di misura A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, cartone da 100 provette di misura A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, cartone da 100 provette di misura A (etichetta a getto d'inchiostro)

XIV 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. 2009. The U.S. pharmacopeia 32/The national formulary 27. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
4. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
11. Horwitz, W. (ed.). 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed, vol.1. AOAC International, Gaithersburg, Md.
12. Reischelderfer and Mangels. 1992. In Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. 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