

**PROCEDURE DI CONTROLLO DI QUALITÀ****I INTRODUZIONE**

**BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C** (terreno tioglicollato **BBL** senza indicatore 135C) è un terreno universale per la coltivazione di microrganismi, in particolare anaerobi obbligati.

**II PROCEDURA DEL TEST**

- Inoculare i campioni rappresentativi con le colture sotto elencate.
  - Svitare parzialmente i tappi e porre le provette in acqua bollente\* per 2 – 5 min. Avvitare bene i tappi subito dopo la rimozione delle provette dal calore e attendere che il terreno si raffreddi a temperatura ambiente prima dell'uso.  
**\*NOTA:** Si sconsiglia l'uso del forno a microonde.
  - Usando pipette sterili da 1,0 mL, inoculare le provette di terreno tioglicollato con 1,0 mL di diluizioni di brodo di coltura di 18 – 24 h. Usare Chopped Meat Carbohydrate Broth per *Bacteroides fragilis* e **Trypticase** Soy Broth per *Staphylococcus aureus*. La diluizione usata per *S. aureus* non deve contenere più di 1.000 UFC/mL, mentre quella per *B. fragilis* deve contenere  $10^5$  –  $10^6$  UFC/mL.
  - Incubare le provette – con i tappi completamente avvitati – a  $35 \pm 2$  °C in aerobiosi.
- Esaminare le provette dopo 18 – 24 e 48 h per verificare la crescita.
- Risultati attesi

| <b>Microrganismi</b>           | <b>ATCC</b> | <b>Recupero</b> |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| * <i>Bacteroides fragilis</i>  | 25285       | Crescita        |
| * <i>Staphylococcus aureus</i> | 25923       | Crescita        |

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

**III CONTROLLO DI QUALITÀ SUPPLEMENTARE**

- Esaminare le provette come descritto in "Deterioramento del prodotto".
- Eseguire un esame visivo delle provette rappresentative per garantire che l'eventuale presenza di difetti fisici non interferisca con l'uso.
- Determinare il pH mediante potenziometria a temperatura ambiente per verificare che rientri nel range specificato di  $7,0 \pm 0,2$ .
- 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 Thioglycollate Medium without Indicator-135C** è un terreno universale arricchito per il recupero di un'ampia gamma di microrganismi, soprattutto anaerobi obbligati, da campioni clinici e altri materiali.

**V SOMMARIO E SPIEGAZIONE**

Il terreno tioglicollato è stato originariamente descritto da Brewer<sup>1</sup> come terreno in grado di favorire la crescita di microrganismi anaerobi obbligati e aerobi. Il terreno tioglicollato originale è stato modificato per assumere la qualità nutritiva di **Trypticase** Soy Broth. La formula migliorata, 135C, ha pertanto un ampio spettro di crescita di microrganismi esigenti patogeni e non patogeni.<sup>2</sup> La formula originale conteneva anche blu di metilene, sebbene attualmente non si usi alcun indicatore Eh. Ciò evita possibili effetti tossici dell'indicatore e facilita anche la rilevazione precoce della crescita.

Il terreno tioglicollato-135C è caratterizzato da una superiore capacità di supportare la crescita, da inoculi minimi, di un'ampia gamma di microrganismi aerobi e anaerobi. Le specie più strettamente aerobie crescono nella parte superiore, mentre quelle anaerobie crescono in profondità nel terreno.

Il terreno tioglicollato-135C è quindi raccomandato per essere usato come terreno universale e per l'esame di emocolture e di tutti gli altri materiali in cui è possibile la presenza di una gamma di microrganismi aerobi, anaerobi o anaerobi facoltativi.

L'incorporazione di peptoni di soia e caseina consente la crescita di alcuni microrganismi aerobi, come per esempio membri del genere *Brucella*, che non crescono rapidamente in Fluid Thioglycollate Medium. Entrambi i terreni supportano la crescita di specie strettamente anaerobie, come per esempio *Clostridium novyi*, *C. acetobutylicum*, *Actinomyces bovis* e *Bacteroides*, nonché di anaerobi facoltativi quali pneumococchi, streptococchi, lattobacilli e altri batteri.

Il brodo può essere utilizzato con siero aggiunto al 10% per la coltivazione di *Trichomonas vaginalis*, la spirocheta di Reiter e altri microrganismi.

È per questa ragione che il terreno è usato con esiti soddisfacenti come coltura di arricchimento per vari tipi di campioni e anche come terreno di trasporto. Allorché usato per tali scopi, si raccomanda l'incorporazione di CaCO<sub>3</sub> perché, in caso contrario, i microrganismi esigenti possono crescere e quindi morire rapidamente; il CaCO<sub>3</sub> serve a neutralizzare l'acido prodotto durante la crescita. In assenza di CaCO<sub>3</sub>, possono verificarsi rapida crescita e morte, per esempio con colture di pneumococchi, cocchi gram-negativi, *C. perfringens* e altri batteri acido-sensibili.

## VI PRINCIPI DELLA PROCEDURA

I peptoni di farina di soia e caseina, il destrosio e la cistina forniscono composti a base di azoto e di carbonio, carboidrati fermentabili e ingredienti in tracce. Il cloruro di sodio fornisce gli ioni essenziali. Lo zolfo è fornito dal solfito di sodio. Il tioglicollato di sodio, un agente riducente, abbassa il potenziale Eh, consentendo così la crescita dei microrganismi anaerobi obbligati in profondità nel terreno. La quantità relativamente piccola di agar favorisce la prevenzione di correnti di convezione nel terreno, contribuendo così a mantenere l'anaerobiosi.<sup>3</sup>

## VII REAGENTI

### BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C

|   |        |
|---|--------|
| Formula 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  |

\*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>4-7</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>3,8</sup> Raccogliere i campioni prima della somministrazione di antibiotici. Predisporre una consegna tempestiva al laboratorio.

## IX PROCEDURA

**Materiale fornito:** BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C

**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.

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 **BBL 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 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. 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 in aerobiosi – con i tappi completamente avvitati – a 35 ± 2 °C o a un'altra temperatura appropriata, a seconda del microrganismo in coltura e verificare ogni giorno per un massimo di 7 giorni prima di classificarle come negative, a meno che non sussistano circostanze speciali tali da legittimare un'incubazione più lunga.<sup>3,9</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 nelle provette di brodo è indicata dalla presenza di torbidità rispetto al controllo non inoculato. Eseguire subcolture in terreni solidi appropriati per ottenere colture pure di isolati che possano a loro volta essere testati e identificati.

## 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.<sup>9</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>3,8,9</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 PERFORMANCE

Prima della spedizione, vengono testate le performance di tutti i lotti di Thioglycollate Medium without Indicator-135C. Prima dell'inoculo, campioni rappresentativi del lotto vengono ridotti mediante ebollizione a bagnomaria per 2 – 5 min. Una volta raffreddate, le provette vengono inoculate con colture di *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Clostridium novyi* (ATCC 7659) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). L'inoculo (1 mL) per *S. aureus* è prelevato da un brodo di coltura corretto per contenere non più di 1.000 Unità Formanti Colonie (UFC) per mL. L'inoculo (1 mL) per *B. fragilis* è prelevato da un brodo di coltura corretto per contenere  $10^5$  –  $10^6$  UFC per mL. L'inoculo (ansa da 0,01 mL) per *C. novyi* è prelevato da un brodo di coltura non diluito, ed è posto sul fondo della provetta. I tappi vengono perfettamente avvitati subito dopo l'inoculo e le provette incubate a  $35 \pm 2$  °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   |
|------------|---|
| 221199     | <b>BD BBL</b> Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, confezione da 10 provette di misura K   |
| 221200     | <b>BD BBL</b> Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, cartone da 100 provette di misura K € € |
| 221047     | <b>BD BBL</b> Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 20 mL, cartone da 100 provette di misura A    |

## 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. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Tenover, M.L. Tenover and M.A. Tenover (ed.). 2007. *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Reischelderfer, C., and J.I. Mangles. 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.

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