

# THIOGLYCOLLATE MEDIUM ALTERNATIVE

## Terreno di coltura in polvere

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno liquido di uso generale per la coltura di batteri aerobi, anaerobi e microaerofili. Adatto per il test di sterilità batterica di prodotti torbidi e viscosi.

### 2 – COMPOSIZIONE

#### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA \*

Tryptone	15,0 g
Estratto di lievito	5,0 g
Glucosio	5,5 g
Sodio cloruro	2,5 g
Sodio tioglicolato	0,5 g
L-cistina	0,5 g

\* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Brewer nel 1940<sup>1</sup> formulò Fluid Thioglycollate Medium, successivamente a precedenti studi di Quastel e Stephenson nel 1926<sup>2</sup> e di Falk, Bucca e Simmons<sup>3</sup> nel 1939, incentrati su formulazioni che consentissero la crescita microbica a partire da bassi inoculi e la crescita di batteri anaerobi in terreni liquidi contenenti una bassa concentrazione di agar e composti riducenti.

Thioglycollate Medium Alternative, noto anche come NIH Thioglycollate Broth e USP Alternate Thioglycollate Medium, è una formulazione alternativa preparata senza agar e resazurina. Questa formula è conforme alle specifiche fornite nella Farmacopea statunitense e nel Formulario nazionale<sup>4,5</sup>. Il terreno è adatto per testare la sterilità di prodotti torbidi e viscosi e per il lavaggio di articoli su cui viene testata la sterilità del lume, quando il lume è molto piccolo. Il terreno può essere utilizzato per la coltura di batteri aerobi e anaerobi facoltativi e, se incubato in condizioni anaerobiche, per la coltura di anaerobi stretti.

La cistina e il tiogliccolato di sodio, a una concentrazione a bassa tossicità per i microrganismi, agiscono come sostanze riducenti reagendo con e rimuovendo l'ossigeno molecolare dal terreno e prevenendo l'accumulo di perossidi, che possono essere letali per alcuni microrganismi aerobi e anaerobi.<sup>6</sup> Gruppi sulfidrilici (SH) dei due composti inattivano l'arsenico, il mercurio e altri composti di metalli pesanti, mantenendo un basso potenziale redox e garantendo condizioni anaerobiche.<sup>6</sup> Un rapporto di 15 mL di terreno liquido e 3 mL di inoculo è sufficiente per inattivare i conservanti mercuriali presenti a una concentrazione non superiore allo 0,08% nel campione. Per la neutralizzazione di altri conservanti, diversi dai composti mercuriali, sono necessarie adeguate diluizioni del campione.

Il triptone e l'estratto di lievito sono fonti di azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita microbica, il glucosio è una fonte di carbonio ed energia, il cloruro di sodio mantiene l'equilibrio osmotico.

### 4 - INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 29 g in 1000 mL di acqua depurata fredda, portare ad ebollizione con agitazione frequente, distribuire e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

### 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, gialla
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	giallo chiaro, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,1 ± 0,2

### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Thioglycollate Medium Alternative	Terreno di coltura in polvere	4021352	500 g (17,2 L)

### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, provette, flaconi, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

### 8 – CAMPIONI

Per il prelievo e la manipolazione dei campioni destinati al test di sterilità consultare la normativa di riferimento.<sup>5</sup>

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per uso generale, inoculare i campioni direttamente nel terreno e incubare le provette fino a 7 giorni a 35 ± 2 °C.

Per applicazioni specifiche, incubare alla temperatura e per il tempo previsti dalle procedure di Laboratorio e in funzione dei microrganismi coltivati. Per eseguire il test di sterilità con Thioglycollate Medium Alternative, è necessario seguire le raccomandazioni dell'USP.<sup>5</sup>

### 10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, la presenza di crescita batterica è evidenziata dalla presenza di torbidità rispetto a un controllo non inoculato.

### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore finale può eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S. aureus</i> ATCC 25293	35°C / 72h / A	buona crescita
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	35°C / 72h / A	buona crescita
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	35°C / 72h / A	buona crescita
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	35°C / 72h / AN	buona crescita

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection



**12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI**

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Thioglycollate Medium Alternative disidratato viene testato per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo della diluizione ad estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di organismi nelle provette e incubando a 35°C per 72 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita nel lotto di riferimento ( $G_{RB}$ ) e nel lotto di prova ( $G_{TB}$ ). La produttività è testata con i seguenti ceppi target: *C. perfringens* ATCC 13124, *C. sporogenes* ATCC 3584, *S. pyogenes* ATCC 12384, *S. pneumoniae* ATCC 6303, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. cerevisiae* ATCC 9763. L'indice di produttività  $G_{RB}-G_{TB}$  per ciascun ceppo di prova deve essere  $\leq 1$ .

**13 – LIMITI DEL METODO**

- Si consiglia di far bollire il terreno prima dell'uso per aumentare la velocità di recupero. Non riscaldare le provette più di una volta per eliminare l'ossigeno assorbito.<sup>6</sup>
- I batteri anaerobi facoltativi a crescita rapida possono crescere in eccesso e mascherare la crescita di anaerobi stretti.
- Alcuni anaerobi possono essere inibiti dai prodotti metabolici o dagli acidi formati durante la crescita di batteri anaerobi facoltativi a crescita rapida.
- La morte rapida dei batteri può verificarsi soprattutto con cocchi Gram-negativi, *S.pneumoniae*, *C.perfringens* e altri organismi sensibili agli acidi; se la sottocoltura dalle provette ai terreni su piastra non rivela crescita microbica, eseguire una colorazione di Gram sulla coltura in brodo.<sup>6</sup>
- Si raccomanda di eseguire test biochimici, immunologici, molecolari o di spettrometria di massa sugli isolati, da coltura pura, per una completa identificazione.

**14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE**

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante e post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it) il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://www.biolifeitaliana.it).
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

**15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ**

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi). L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati autonomamente e della validazione della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre, provette, flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo MacFaddin, i tubi/flaconi preparati in laboratorio devono essere preparati al momento, bolliti e raffreddati entro 4 ore dall'uso.<sup>6</sup>

**16 - BIBLIOGRAFIA**

1. Brewer JH. Clear liquid medium for the "aerobe" cultivation of anaerobes. J Am Med Assoc 1940; 115:598-600
2. Falk CR, Bucca HB, Simmons MP. A comparative study of the use of varying concentrations of agar in the test medium used to detect contaminants in biologic products. J Bacteriol 1939; 37:121-131.
3. Quastel JH, Stephenson M. Experiments on "strict" anaerobes: the relationship of *B. sporogenes* to oxygen. J Biochem 1926; 20:1125-1137.
4. N.I.H. Memorandum, Culture Media for Sterility Tests, 4th Revision (1955)
5. The United States Pharmacopeia/National Formulary, current edition
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Utilizzare entro	Fabbricante	
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> test	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Proteggere dalla luce	Proteggere dall'umidità

**CRONOLOGIA DELLE REVISIONI**

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

