



ISTRUZIONI PER L'USO

THIOGLYCOLLATE MEDIUM

Terreno di coltura in polvere



Thioglycollate Medium. Da sinistra: provetta non inoculata, anaerobio facoltativo (*S.aureus*), anaerobio (*B.fragilis*), aerobio (*P.aeruginosa*)

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno liquido d'uso generale per la coltivazione di batteri aerobi, anaerobi, microaerofili da campioni clinici e da altri materiali. Indicato per il test di sterilità batterica in accordo al metodo armonizzato EP, USP, JP.

2 – COMPOSIZIONE**FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)***

Triptone	15,000 g
Estratto di lievito	5,000 g
Glucosio	5,500 g
Sodio cloruro	2,500 g
L-cistina	0,500 g
Sodio tioglicolato	0,500 g
Resazurina	0,001 g
Agar	0,750 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Thioglycollate Medium, noto anche come Fluid Thioglycollate Medium, è un terreno liquido concepito da Brewer¹ nel 1940, in virtù di studi precedenti di Quastel and Stephenson² del 1926 e di Falk, Bucca e Simmons³ del 1939, focalizzati su formulazioni che consentissero la crescita a partire da bassi inoculi e la crescita dei batteri anaerobi in un brodo di coltura contenente una bassa concentrazione di agar e composti riducenti.

Il terreno Thioglycollate Medium qui descritto è preparato secondo la formulazione indicata dal metodo armonizzato EP, USP, JP per il test di sterilità dei prodotti farmaceutici.⁴

La cistina ed il sodio tioglicolato, ad una concentrazione in cui possiede una ridotta tossicità per i microrganismi, agiscono come sostanze riducenti eliminando le molecole di ossigeno dal terreno e prevenendo l'accumulo di perossidi, letali per alcuni microrganismi aerobi e anaerobi.⁵ I gruppi sulfidrilici (SH) dei due composti inattivano inoltre i composti mercuriali, i composti a base di arsenico e di altri metalli pesanti, mantenendo un basso potenziale di ossidoriduzione ed assicurando condizioni di anaerobiosi.

L'agar presente alla concentrazione dello 0,75%, aiuta nell'inizializzazione della crescita degli anaerobi e ne consente la crescita a partire da bassi inoculi; esso ritarda inoltre la diffusione dell'ossigeno nel mezzo e permette solo una lenta liberazione dal terreno delle sostanze riducenti prodotte dai microrganismi e dell'anidride carbonica.⁵ La resazurina è presente nel terreno come indicatore di ossidoriduzione, in sostituzione del blu di metilene presente nella formula originale di Brewer e più tossico: il viraggio al rosa della resazurina è indice di presenza di condizioni aerobiche. Il peptone di caseina e l'estratto di lievito sono fonti di azoto, carbonio, vitamine e sali minerali per la crescita microbica, il glucosio è una fonte di carbonio e di energia, il sodio cloruro consente di mantenere un adeguato tenore osmotico al brodo di coltura.

Thioglycollate Medium può essere arricchito con svariati composti, tra i quali la Vitamina K per stimolare la crescita di alcuni ceppi di *Bacteroides* e *Prevotella* ed emina, quale fonte di fattore X, per incrementare la crescita microbica.

4 – METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 30 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione, distribuire in provette o flaconi ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare rapidamente e conservare al buio a temperatura ambiente.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in provetta o flacone

paglierino, limpido a caldo, leggermente opalescente, con anello rosa nella parte superiore del terreno quando raffreddato a temperatura ambiente

pH (20-25°C)

7,1 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Thioglycollate Medium	Terreno di coltura in polvere	4021372	500 g (16,7 L)
		4021374	5 kg (167 L)

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio tarata e controllata, provette e flaconi autoclavabili, anse da microbiologia, reagenti e terreni di coltura accessori.

8 - CAMPIONI

In microbiologia clinica il terreno può essere inoculato con qualsiasi tipo di campione dal quale si intendano coltivare batteri aerobi, anaerobi o microaerofili come ad esempio tessuti, essudati purulenti, ferite ed ascessi.^{5,6} Quando possibile, raccogliere il campione prima dell'inizio della terapia antimicrobica. Applicare le norme di buona prassi di laboratorio per la raccolta, la conservazione ed il trasporto in





Laboratorio dei campioni. Per campioni farmaceutici sui quali eseguire il test di sterilità, fare riferimento alla Farmacopea Europea ed alle modalità di raccolta dei campioni ivi descritte.⁴

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Prima dell'uso, nel caso nelle provette o nei flaconi vi sia una colorazione rosa, (indicativa di condizioni di aerobiosi) o la soluzione presenti aggregati dovuti alla presenza dell'agar, è necessario svitare parzialmente i tappi e porre le provette o i flaconi in acqua bollente per circa 5 min finché il terreno non si sia ridotto (incolore) e gli aggregati si siano sciolti.

Raffreddare rapidamente, avvitando bene i tappi, per evitare l'introduzione di aria non sterile nel contenitore.

Inoculare le provette o i flaconi direttamente con i campioni ed incubare a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 7 giorni.

Per usi specifici, incubare alla temperatura e per il tempo previsto dalle proprie procedure ed in funzione del microrganismo che si desidera coltivare.

Per il test di sterilità fare riferimento alla Farmacopea Europea ed alle modalità di semina ed incubazione ivi descritte.⁴

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, la presenza di crescita batterica è indicata da un intorbidamento di varia entità del brodo di coltura:

i microrganismi strettamente aerobi tendono a crescere sulla superficie del brodo nello strato ossidato di colore rosa, mentre gli anaerobi crescono soltanto nello strato di brodo più profondo, ridotto e privo di colore rosa i microaerofili coltivano nello strato di mezzo.

11 - CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accertamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità¹⁰

CEPPI DI CONTROLLO			INCUBAZIONE	RISULTATI ATTESI
			T° / t / ATM	
<i>B.fragilis</i> **	ATCC	25285	35-37°C / 48h - A	buona crescita
<i>S.aureus</i> **	ATCC	25293	35-37°C / 48h - A	buona crescita
<i>C.sporogenes</i> *	ATCC	19404	35-37°C / 72h - A	buona crescita
<i>P.aeruginosa</i> *	ATCC	9027	35-37°C / 72h - A	buona crescita
<i>S.aureus</i> *	ATCC	6538	35-37°C / 72h - A	buona crescita
<i>B.subtilis</i> *	ATCC	6633	35-37°C / 72h - A	buona crescita
<i>C.albicans</i>	ATCC	10231	35-37°C / 72h - A	buona crescita
<i>C.perfringens</i> ***	ATCC	13124	35-37°C / 18-24 h - A	buona crescita

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

*: ceppi indicati da EP⁸; **: ceppi indicati da CLSI⁹; ***: ceppo indicato da ISO 11133:2014/Amd 1:2018⁹

12 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di terreno in polvere Thioglycollate Medium vengono testati per la produttività, avendo come riferimento un lotto precedentemente approvato e considerato come Lotto di Riferimento.

La produttività del terreno è valutata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni appropriate di ceppi target nelle provette, incubando a 35-37°C per 18-72 ore e registrando la diluizione più alta ove si osserva crescita, nel Lotto di Riferimento (Cr_{LR}) e nel lotto in esame (Cr_{LE}). La produttività è valutata con i seguenti ceppi target: *C.sporogenes* ATCC 19404, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *S.aureus* ATCC 6538, *S.aureus* ATCC 25923, *B.subtilis* ATCC 6633, *C.albicans* ATCC 10231, *S.pyogenes* ATCC 12384, *C.perfringens* ATCC 13124, *B.fragilis* ATCC 25285.

L'indice di produttività ($Cr_{LR}-Cr_{LE}$) per ciascun ceppo è giudicato conforme quando è ≤ 1 .

13 - LIMITI DEL METODO

- I batteri anaerobi facoltativi a crescita rapida possono crescere in eccesso e mascherare la crescita degli anaerobi.
- Alcuni anaerobi possono essere inibiti dai prodotti metabolici o dagli acidi che si formano durante la crescita dei batteri anaerobi facoltativi a crescita rapida.
- I batteri cresciuti nel terreno possono andare incontro alla perdita della loro vitalità; nel caso la subcoltura da Thioglycollate Medium su terreno solido in piastra non rivela crescita microbica eseguire una colorazione Gram sulla coltura in brodo. Nel caso le provette di Thioglycollate Medium vengano usate per la conservazione dei batteri aggiungere a ciascuna provetta circa 0,1g di calcio carbonato che neutralizza gli acidi che si producono durante la crescita microbica, promuove la vitalità batterica e la formazione di spore, migliorando in questo modo la conservabilità dei batteri acido-sensibili come pneumococchi, cocchi gram-negativi, *Clostridium perfringens*.
- Le colonie cresciute presenti nelle provette, devono essere sottoposte, previa loro purificazione, ad una completa identificazione con tecniche biochimiche, immunologiche, molecolari o di spettrometria di massa e, se pertinente, sottoposte al test di sensibilità agli antibiotici.
- Il terreno di coltura qui descritto è da intendersi come un ausilio alla diagnosi delle infezioni microbiche. L'interpretazione dei risultati deve essere fatta considerando la storia clinica del paziente, l'origine del campione ed i risultati di altri test diagnostici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è un diagnostico *in vitro* di tipo qualitativo, 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 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.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti 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.
- Comunicare a Biolife Italiana Srl (complaint@biolifeitaliana.it) ed alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione all'uso del diagnostico *in vitro*.
- 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

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. 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 (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Brewer JH. Clear liquid medium for the "aerobe" cultivation of anaerobes. J Am Med Assoc 1940; 115:598-600
2. Falk Bucca and Simmons. J Bacteriol 1939; 37:121
3. Quastel and Stephenson. J Biochem 1926; 20:1125
4. European Pharmacopoeia, current edition.
5. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
6. Baron EJ, Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In Jorgensen JH, Carrol KC, Funke G et al. editors. Manual of clinical microbiology, 11th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2015.
7. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. 2nd ed. 2003; Geneva: World Health Organization
8. CLSI (formerly NCCLS) Quality Control of Commercially Prepared Culture Media. Approved Standard, 3rd edition. M22 A3 vol. 24 n° 19, 2004.
9. ISO 11133:2014/Amd.1:2018 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Amendment 1

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	 Fabbricante	 Utilizzare entro
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout	07/2020
Revisione 7	Modifiche a: "precauzioni ed avvertenze", "conservazione e validità"	03/2022
Revisione 8	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023
Revisione 9	Aggiornamento procedura d'analisi in accordo ad EP	02/2025

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

