

ISTRUZIONI PER L'USO

THIOGLYCOLLATE MEDIUM

Provette pronte all'uso


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

1 - DESTINAZIONE D'USO

Dispositivo 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 *

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
Acqua purificata	1000 mL

*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%, facilita la 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.

4 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in provetta

paglierino, limpido a caldo, leggermente opalescente a temperatura ambiente, con anello rosa

pH (20-25°C)

7,1 ± 0,2

5 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONE

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Thioglycollate Medium	Provette pronte all'uso	552137	20 x 10 mL. Provette di vetro 17x125 mm, con fondo piatto e tappo a vite; confezionamento in scatola di cartone.

6 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Anse e tamponi sterili da microbiologia, termostato e strumentazione di laboratorio, terreni di coltura accessori e reagenti per l'identificazione delle colonie.

7 - 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





8 – 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 ± 2 °C per 7 giorni.

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

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

9 - 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.

10 - 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 responsabilità dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, alle regole dell'accreditamento 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 T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>B.fragilis</i> **	ATCC 25285	35-37°C / 48h - A	buona crescita
<i>S.aureus</i> **	ATCC 25293	35-37°C / 48 h -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.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 EP⁴; **:ceppi indicati da CLSI⁹; *** ceppo indicato da ISO 11133:2014/Amd 1:2018⁹

11 - CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di provette pronte all'uso e della materia prima per la loro produzione (terreno in polvere Thioglycollate Medium REF 402137) 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 .

12 - LIMITI DEL METODO

- Non far bollire più di una volta il terreno, poiché frequenti bolliture possono portare alla formazione di prodotti tossici.
- 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, soprattutto cocchi Gram-negativi, *S.pneumoniae*, *C.perfringens* ed altri microrganismi acido-sensibili, 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.⁵
- Il terreno non deve essere utilizzato per i test di fermentazione perché contiene estratto di lievito ad alto contenuto di carboidrati.⁵
- 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.

13 - 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.
- Il prodotto qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione europea vigente.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materie prime di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione dei materiali 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 d'uso specifiche per i prodotti 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.
- Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminazioni con il terreno e con gli agenti microbici.
- La singola provetta del prodotto qui descritto è monouso. Non suddividere il contenuto delle provette.
- Fare attenzione quando si aprono le provette con tappo a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.





- Il prodotto qui descritto è soggetto a sterilizzazione terminale in autoclave a vapore.
- Sterilizzare le provette dopo l'uso e prima della loro eliminazione. Smaltire le provette non utilizzate e le provette seminate con i campioni o con i ceppi di controllo in accordo alla legislazione vigente in materia.
- 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.

14 - CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a 2-25°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare le provette oltre la data di scadenza. Dopo l'apertura della scatola, le provette possono essere utilizzate fino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere utilizzate immediatamente. Prima dell'uso verificare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Non utilizzare le provette se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione microbica, colore alterato).

15 - 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; Geneve: 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	o REF	LOT Numero di lotto	IVD Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>	Fabbricante	Non riutilizzare	Imballaggio riciclabile Lato superiore
Limiti di temperatura	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Consultare le Istruzioni per l'Uso	Utilizzare entro	Fragile maneggiare con cura	Proteggere dalla luce diretta	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del layout in accordo a IVDR 2017/746	06/2021
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 7	Rimozione della classificazione obsoleta	04/2023
Istruzioni per l'Uso (IFU)-Revisione 8	Aggiornamento procedura d'analisi e temperatura conservazione in accordo ad EP	02/2025

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

