BD Fluid Thioglycollate Medium (FTM)

VERWENDUNGSZWECK

BD Fluid Thioglycollate Medium (BD Flüssiges Thioglykolat-Medium) ist ein flüssiges Universal-Anreicherungsmedium, welches bei qualitativen Verfahren in Sterilitätstests und zur Isolierung und Kultivierung von nicht übermäßig anspruchsvollen aeroben, anaeroben und mikroaerophilen Mikroorganismen verwendet wird. In der klinischen Mikrobiologie kann es als Anreicherungsmedium für klinische Proben verwendet werden.

GRUNDLAGEN UND ERLÄUTERUNG DES VERFAHRENS

Mikrobiologische Methode.
Das flüssige Thioglykolat-Medium wurde von Brewer für die schnelle Kultivierung von anaeroben und aeroben Organismen entwickelt.[1] Die Zugabe von Casein-Pepton wurde 1944 von Vera eingeführt.[2]
Dieses Medium ist imstande, ein reiches Wachstum bei einer großen Vielzahl von Organismen, einschließlich obligaten Anaerobiern, ohne Inkubation in einer anaeroben Atmosphäre zu fördern. Ein Merkmal von Natriumthioglykolat, zusätzlich zur Senkung des Redoxpotentials, ist seine Fähigkeit, die antibakterielle Aktivität von quecksilberhaltigen Stoffen zu neutralisieren. Diese Eigenschaften von FTM sind besonders wertvoll beim Nachweis einer Kontamination in biologischen Stoffen und anderen Materialien. Auf Grund ihrer wachstumsfördernden Eigenschaften wird diese Rezeptur im Arzneimittelbuch der USA (United States Pharmacopeia, USP) und in der Europäischen Pharmakopöe (EP) als Sterilitätstest- und Anreicherungsmedium geführt.[3-6] Flüssiges Thioglykolat-Medium wird ebenfalls häufig als Anreicherungsmedium in der klinischen Mikrobiologie verwendet, insbesondere für Proben aus primär sterilen Körperbereichen.[7]
Auf Grund seines niedrigen oxidations-reduzierenden Potenzials ist **BD Fluid Thioglycollate Medium** nicht das ideale Medium für obligate Aerobier, wie z.B. Nichtfermenter, *Micrococcus* oder ähnliche Organismen. Für solche Organismen sollte Tryptic-Soja-Bouillon oder Hirn-Herz-Infus-Bouillon verwendet werden.

In **BD Fluid Thioglycollate Medium** liefern Glucose, Pepton und Hefeextrakt die für das bakterielle Wachstum erforderlichen Wachstumsfaktoren. Natriumthioglykolat und L-Cystin sind Reduktionsmittel, welche die Akkumulation der für einige Mikroorganismen letalen Peroxide reduziert. Resazurin ist ein Redoxindikator; wenn er oxidiert wird, zeigt er eine Rosafärbung, wenn er reduziert wird, ist er farblos. Die geringe Menge Agar unterstützt die Wahrung eines niedrigen Redoxpotentials, indem es das Medium gegen Konvektionsströme stabilisiert und somit eine Anaerobiose in den tieferen Schichten des Mediums gewährleistet.[8] Auf Grund seines Agargehaltes erscheint flüssiges Thioglykolat-Medium oft leicht opak.
Das in diesem Dokument beschriebene gebrauchsfertige Medium wird unter einem Strom von Stickstoffgas abgefüllt, was zu einer Entfärbung des Resazurin-Indikators führt. Die Medien können jedoch so lange verwendet werden, bis ca. 30 % des Mediums (oberste Schicht) oxidiert sind. Dies zeigt sich anhand der Rosafärbung des Resazurins nahe der Oberfläche. Ist der Oxidationsprozess weiter fortgeschritten, kann die Bouillon noch einmal in Dampf oder kochendem Wasser erhitzt und anschließend abgekühlt und verwendet werden.
Die USP erlaubt das Vorhandensein von Wasser in Glucose (=Dextrose) und führt deshalb 5,5 g in der Rezeptur auf.[3] Da das Vorhandensein von Feuchtigkeit in Trockenmedien unerwünscht ist, wird die gleiche Menge Glucose in der wasserfreien Form beigefügt.

REAGENZIEN

BD Fluid Thioglycollate Medium (FTM)

Zusammensetzung* pro Liter destilliertem Wasser

Hefeextrakt	5,0 g	Natriumchlorid	2,5 g
Pankreatisch abgebautes Casein	15,0	Natriumthioglykolat	0,5
Glucose (wasserfrei)	5,0	Resazurin	0,001
L-Cystin	0,5	Agar	0,75

pH 7,1 ± 0,2

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD . Nur für den professionellen Gebrauch.

Fläschchen bei Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Verfärbung, Austrocknung, Rissen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

Hinweise zu Verfahren unter Einhaltung aseptischer Arbeitsweise, Biogefährdung und Entsorgung des gebrauchten Produkts sind der **ALLGEMEINEN GEBRAUCHSANLEITUNG** zu entnehmen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT

Fläschchen nach Erhalt bis kurz vor der Anwendung im Dunkeln bei 2 – 8 °C aufbewahren. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Die Fläschchen können bis zum Verfallsdatum (s. Kennzeichnung auf dem Behälter oder der Verpackung) inokuliert und entsprechend den empfohlenen Inkubationszeiten inkubiert werden.

Fläschchen aus geöffneten Packungen können bis zum Verfallsdatum verwendet werden. Geöffnete Fläschchen sofort verwenden.

QUALITÄTSSICHERUNG DURCH DEN ANWENDER

Proben mit den in der untenstehenden Tabelle aufgeführten Organismen testen. Um den Anforderungen von USP und EP zu entsprechen, muss ein Inokulum von 10 – 100 KBE pro Behälter verwendet werden.[3-5] Gemäß der Europäischen Pharmakopöe Behälter für maximal 3 Tage in normaler Luft bei 30 – 35 °C inkubieren. Für das optimale Wachstum von obligaten Aerobiern sollten die Fläschchen während der Inkubation belüftet werden. Das kann durch leichtes Lösen des Verschlusses erreicht werden.

Teststamm	**Zu erwartendes Wachstum (=Trübung)***
Staphylococcus aureus ATCC 6538	+++ oder stärker
Micrococcus luteus ATCC 9341	++ oder stärker
Bacillus subtilis ATCC 6633	++ oder stärker
Pseudomonas aeruginosa, ATCC 9027	+++ oder stärker
Clostridium sporogenes ATCC 19404	+++ oder stärker
Clostridium sporogenes ATCC 11437	+++ oder stärker
Bacteroides vulgatus, ATCC 8482	+++ oder stärker
Nicht inokuliert	Klar bis leicht opaleszierend, hell bernsteinfarben, oberste Schicht u.U. pinkfarben

* ++++ = starke Trübung ; +++ = mäßige Trübung ; ++ = Trübung ; + = leichter Schleier

VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

BD Fluid Thioglycollate Medium, erhältlich in Fläschchen (für Einzelheiten siehe **VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE**)

STERILE

Nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien und Laborgeräte nach Bedarf.

Probenarten
BD Fluid Thioglycollate Medium kann als Anreicherungsmedium für alle klinischen und nicht klinischen Probenarten verwendet werden. Normalerweise sollten Anreicherungskulturen nur inokuliert werden, wenn die Proben aus primär sterilen Körperbereichen stammen. Es ist zu beachten, dass einige obligate Anaerobier für optimales Wachstum Hämin und Vitamin K benötigen. Falls das Vorhandensein solcher Organismen wahrscheinlich ist, kann das Medium mit 10 mg Hämin-Hydrochlorid und 1 mg Vitamin K1 (Menadion) pro Liter ergänzt werden.

Testverfahren
BD Fluid Thioglycollate Medium kann normalerweise ohne weitere Vorbehandlung verwendet werden. Falls mehr als 30 % des Mediums vor der Anwendung oxidiert sind (was durch die Rosafärbung des Resazurin-Indikators angezeigt wird), kann das Medium noch einmal 5 Minuten lang mit leicht gelöstem Verschluss mit Dampf oder kochendem Wasser erhitzt, abgekühlt und danach verwendet werden. Da das Medium unter einem Strom von Stickstoffgas abgefüllt wird, verbessert eine Belüftung der Behälter während der Inkubation das Wachstum von obligat aeroben Bakterien. Das kann durch leichtes Lösen des Verschlusses erreicht werden.

Für die Verwendung in der klinischen Mikrobiologie kann das Medium mit 10 mg Hämin-Hydrochlorid pro L (eine zehnfache Stammlösung in 0,1 N NaOH zubereiten, filtersterilisieren und die entsprechende Menge in das Fläschchen geben) und 1 mg Vitamin K1 pro L (eine zehnfache Stammlösung in absolutem Äthylalkohol zubereiten, filtersterilisieren und die entsprechende Menge in das Fläschchen geben) ergänzt werden. Die Hämin- und Vitamin K-Stammlösungen können 4 Wochen im Dunkeln gekühlt aufbewahrt werden. Ein Ergänzung ist nicht notwendig, wenn eine ausreichende Menge Blut oder Serum aus der Probe während der Inokulation in das Fläschchen gegeben werden. Proben direkt in das Medium inokulieren und die Röhrchen bis zu 7 Tage bei 35 ± 2 °C inkubieren. Die Proben sollten ebenfalls direkt auf feste Medien inokuliert werden, wie z.B. **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** (BD Columbia Agar mit 5 % Schafblut) oder **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood** (BD Trypticase-Soja-Agar II mit 5 % Schafblut), sowie schließlich auf zusätzliche selektive und nicht selektive Medien. Zur Isolierung und Kultivierung von obligaten Anaerobiern sollte **BD Schaedler Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood** (BD Schaedler-Agar mit Vitamin K1 und 5 % Schafblut) verwendet werden. Da **BD Fluid Thioglycollate Medium** für die Anreicherung von gewissen obligaten Aerobiern nicht optimal ist, kann ein zweites flüssiges Anreicherungsmedium, z.B. Hirn-Herz-Infus-Bouillon, mit der Probe inokuliert werden.
Für Sterilitätstests müssen die Empfehlungen des Arzneimittelbuches der USA (United States Pharmacopeia, USP) oder der Europäischen Pharmakopöe und die Empfehlungen einer Vielzahl anderer Kontrollorganisationen befolgt werden.[3-6] Diese Referenzquellen legen das Verhältnis des Mediums zum Produkt fest, das bei den Sterilitätstests eingehalten werden muss, und liefern detaillierte Informationen zur Probenentnahme und zur Interpretation der Testergebnisse. Wenn die Testprobe das Medium so eintrübt, dass mikrobielles Wachstum nur schwer erkennbar ist, sollte die Probe auf ein frisches Medium transferiert werden.

Ergebnisse
Nach der Inkubation zeigt sich das Wachstum durch eine Trübung der Bouillon in den Röhrchen. Im Zweifelsfall sollten geeignete Proben auf Plattenmedien subkultiviert werden. Falls die isolierten Organismen weiter identifiziert werden sollen, ist ebenfalls auf diese Weise vorzugehen. Wird das Medium vor oder während der Inkubation belüftet, wachsen obligate Anaerobier nur im Bereich der Bouillon, der sich unter der oxidierten obersten (pinkfarbenen) Schicht befindet.
Zur Isolierung von Erregern aus klinischen Proben eine Menge von 10 – 50 µL des inkubierten Mediums auf **BD Columbia Agar with 5% Sheep Blood** oder **BD Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood** für die aeroben Organismen und auf **BD Schaedler-Agar with Vitamin K1 and 5% Sheep Blood** oder **BD CDC Anaerobe Agar with 5% Sheep Blood** für obligate Anaerobier subkultivieren. Für diese Subkulturen müssen die geeigneten atmosphärischen Bedingungen bereitgestellt werden.

LEISTUNGSMERKMALE UND VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

BD Fluid Thioglycollate Medium wird als Anreicherungsmedium für viele nicht klinische und klinische Anwendungen verwendet.[3-5,7,8]. Auf Grund seiner stark reduzierenden Eigenschaften sorgt es für eine Anaerobiose auch ohne Inkubation in einer anaeroben Atmosphäre. Zur optimalen Isolierung von anspruchsvollen Anaerobiern, wie z.B. *Prevotella* spp., sollte das Medium mit Hämin und Vitamin K1 ergänzt werden (s. **Testverfahren**).

Obwohl die meisten obligaten Aerobier (z.B. *Micrococcus*, *Pseudomonas* und verwandte Genera, sowie obligate aerobe sporenbildende Stäbchen) in diesem Medium Wachstum zeigen, wenn die Fläschchen während der Inkubation belüftet werden (üblicherweise wachsen sie als dünner Film nahe der Oberfläche), ist flüssiges Thioglykolat-Medium nicht das optimale Medium zur Isolierung von obligaten Aerobiern. Für deren Isolierung sollte Tryptic-Soja-Bouillon oder Hirn-Herz-Infus-Bouillon verwendet werden.

Einmal wieder erhitzt, sollte FTM nicht mehr erhitzt werden, da dies die mikrobiologische Leistung des Mediums verringern kann.

Das in diesem Medium erhaltene Wachstum muss auf geeignete feste Medien subkultiviert werden, um Reinkulturen zu erhalten, welche danach mit für die Isolate geeigneten Verfahren identifiziert werden können.

LITERATUR

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. 1999. The U.S. Pharmacopeia 24/The national formulary 19--2000. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md
4. Council of Europe, 1996. European Pharmacopoeia, 3rd edition. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
5. Council of Europe, 2000. European Pharmacopoeia, Supplement 2001. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France.
6. Cunniff, P. (ed.). 1995. Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC International, Gaithersburg, Md.
7. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.

VERPACKUNG/LIEFERBARE PRODUKTE

BD Fluid Thioglycollate Medium : Gebrauchsfertiges Flaschenmedium
Best.-Nr. 257144 50 Fläschchen; 20 mL Füllmenge in 30 mL Fläschchen mit Schraubverschluss

WEITERE INFORMATIONEN

Weitere Informationen erhalten Sie bei Ihrer örtlichen BD-Vertretung.

BD Diagnostic Systems
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

BD Diagnostic Systems Europe
Becton Dickinson France SA
11 rue Aristide Bergès
38800 Le Pont de Claix/France
Tel: +33-476 68 3636 Fax: +33-476 68 3292 http://www.bd.com

BD and BD logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company.
ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
© 2003 Becton, Dickinson and Company