

POSTUPCI KONTROLE KVALITETE (Neobavezno)**I UVOD**

Fluid Thioglycollate Medium (Tekuća tioglikolatna podloga) podloga je za općenitu namjenu za uzgoj anaerobnih, mikroaerofilnih i aerobnih organizama i preporučuje se kao jedna od podloga za ispitivanje sterilnosti bioloških proizvoda.

II POSTUPAK ISPITIVANJA UČINKOVITOSTI

1. Inokulirajte reprezentativne uzorke s dolje navedenim kulturama.

- Prije upotrebe popustite čepove i stavite epruvete u kipuću vodu* na otprilike 5 min dok se podloga ne reducira (bezbojna). Zategnite čepove odmah nakon što ih maknete s izvora topline. Pričekajte da se podloga ohladi na sobnu temperaturu.

***NAPOMENA:** Upotreba mikrovalne pećnice ne preporučuje se.

- Iz kultura sojinog bujona **Trypticase** starih 24 – 48 h ili kultura obogaćenih tioglikolatnim podlogama za sojeve *Bacteroides* i *Clostridium*, pripremite otopinu koja sadrži 100 ili manje CFU/mL.

- Sterilnim pipetama od 1,0 mL inokulirajte epruvete s 0,75 mL otopina.

- Inkubirajte epruvete s odviđenim čepovima na 30 – 35 °C u aerobnoj atmosferi osim za sojeve CLSI (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) koji se moraju inkubirati sa zategnutim čepovima.

2. Potražite rast u epruvetama sa sojevima CLSI-preporučenim kontrolnim sojevima (zategnuti čepovi) u vremenu od 18 – 24 i 48 h. Potražite rast drugih kontrolnih sojeva u epruvetama (*USP*-preporučeni) u vremenu do 3 dana.

3. Očekivani rezultati

CLSI organizmi	ATCC	Izolacija
* <i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Rast
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Rast

Dodatni organizmi

(*USP* ispitivanje svojstava koja pospešuju rast)

** <i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Rast
** <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Rast
** <i>Clostridium sporogenes</i>	11437	Rast
** <i>Clostridium sporogenes</i>	19404	Rast
** <i>Bacillus subtilis</i>	6633	Rast
** <i>Kocuria rhizophila</i>	9341	Rast
** <i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	Rast

* Preporučeni soj organizama za korisničku kontrolu kvalitete.

** Za provjeru uspješnosti rasta za upotrebu s ispitivanjima sterilnosti *USP*.

III DODATNA KONTROLE KVALITETE

- Pregledajte epruvete prema objašnjenju iz poglavlja „Pogoršanje kvalitete proizvoda”.
- Vizualno pregledajte reprezentativne epruvete kako biste utvrdili da nemaju fizičkih oštećenja koja mogu utjecati na upotrebu.
- Odredite potencijetrom pH vrijednost na sobnoj temperaturi kako biste provjerili odgovara li propisanim vrijednostima $7,1 \pm 0,2$.
- Inkubirajte neinokulirane reprezentativne epruvete na 20 – 25 °C i 30 – 35 °C te nakon 7 dana potražite kontaminaciju mikrobima.

INFORMACIJE O PROIZVODU**IV NAMJENA**

Tekuća tioglikolatna podloga u skladu je sa specifikacijama *The United States Pharmacopeia (USP)*.

Tekuća tioglikolatna podloga koristi se za ispitivanje sterilnosti bioloških proizvoda i za uzgoj anaerobnih, aerobnih i mikroaerofilnih organizama.

V SAŽETAK I OBJAŠNJENJE

Brewer je napravio tekuću tioglikolatnu podlogu za brzi uzgoj anaerobnih i aerobnih organizama.¹ Prvo je napravljena u dehidriranom obliku u Baltimore Biological Laboratory (BBL) (Baltimorski biološki laboratorij) 1940. godine. Inkorporaciju kazein peptona uveo je Vera 1944. godine.²

Ova podloga podržava dobar rast niza različitih zahtjevnih organizama patogenih i nepatogenih vrsta. Karakteristika natrijevog tioglikolata, uz smanjivanje oksidacijsko-redukcijskog potencijala, njegova je sposobnost da neutralizira antibakterijsku aktivnost sastojaka žive. Te karakteristike čine tekuću tioglikolatnu podlogu osobito korisnom za određivanje prisutnosti kontaminacije bioloških i drugih materijala. Formula BBL udovoljava zahtjevima ispitivanja uspješnosti rasta *USP*.³

Tekuća tioglikolatna podloga može se nakon što se pripremi do oksidacije od otprilike 30% podloge, što je vidljivo ružičastom bojom resazurina na površini. Ako je oksidacija više uznapredovala, bujon se može ponovno jednom zagrijati u pari ili kipućoj vodi, ohladiti i koristiti.

VI NAČELA POSTUPKA

Dekstroza, pepton, L-cistin i ekstrakt kvasca pružaju potrebne faktore rasta za bakterijsku replikaciju. Natrijev klorid osigurava neophodne ione. Natrijev tioglikolat reducirajući je agens koji sprečava taloženje peroksida koji su smrtonosni za neke mikroorganizme. L-cistin je također reducirajući agens budući da sadrži grupe sulfidila koje inaktiviraju sastojke teških metala i zadržavaju niski potencijal redoks reakcija, te podržavaju anaerobiozu. Resazurin je pokazivač oksidacije – redukcije, budući da je ružičast kad oksidira i bezbojan kad reducira. Mala količina agara pomaže u održavanju niskog potencijala redoks reakcija stabiliziranjem podloge od konvekcijskih strujanja, zbog čega održava anaerobiozu u nižim dubinama podloge.⁴ *USP* navodi 5,5 g/L dekstroze u formuli tekuće tioglikolatne podloge. Formula **BBL** sadrži anhidridan oblik dekstroze (5,0 g/L).

VII REAGENSI

Fluid Thioglycollate Medium

Približna formula* po litri pročišćene vode

Pankreatična digestija kazeina.....	15,0 g	Natrijev klorid	2,5 g
L-Cistin	0,5 g	Natrijev tioglikolat	0,5 g
Dekstroza (anhidridna)	5,0 g	Resazurin.....	0,001 g
Ekstrakt kvasca	5,0 g	Agar	0,75 g

*Prilagođeno i/ili dodano prema potrebi kako bi se udovoljilo kriterijima učinkovitosti.

Upozorenja i mjere opreza: Za *in vitro* dijagnostiku.

Treba biti oprezan prilikom prijavljivanja rezultata direktnog bojenja po Gramu i/ili drugog direktnog mikrobiološkog bojenja s ovom podlogom zbog moguće prisutnosti nevjabilnih organizama u hranjivoj podlozi.

Epruvete sa zategnutim čepovima treba oprezno otvarati kako ne bi došlo do ozljeda pri pucanju stakla.

U kliničkim uzorcima mogu biti prisutni patogeni mikroorganizmi, uključujući viruse hepatitisa i virus humane imunodeficijencije. Pri rukovanju svim predmetima kontaminiranim krvlju i drugim tjelesnim tekućinama treba se pridržavati „Standardnih mjera opreza“⁵⁻⁸ i institucionalnih smjernica. Nakon upotrebe, pripremljene epruvete, spremnici za uzorke i ostali kontaminirani materijali moraju se sterilizirati u autoklavu prije odlaganja.

Upute za čuvanje: Epruvete po primitku čuvajte na tamnom mjestu u skladu s uputama na naljepnici. Pazite da ne dođe do smrzavanja i pregrijavanja. Otvorite neposredno prije upotrebe. Smanjite izlaganje svjetlosti na najmanju moguću mjeru. Podloge u epruvetama koje se čuvaju prema uputama na naljepnici prije same upotrebe mogu se inokulirati sve do isteka roka valjanosti i inkubirati tijekom preporučenih rokova inkubacije. Prije inokulacije pričekajte da se podloga zagrije do sobne temperature.

Pogoršanje kvalitete proizvoda: Ne upotrebljavajte epruvete ako imaju vidljive znakove kontaminacije mikrobima, promjena boje, sušenje ili ostale znakove pogoršanja kvalitete.

VIII PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE

Uzorci pogodni za podlogu mogu se obraditi raznim tehnikama. Detaljne informacije potražite u odgovarajućim tekstovima.^{9,10} Uzorke treba uzeti prije dodavanja protumikrobnih agensa. Potrebno je izraditi propise za brzu dostavu u laboratorij.

IX POSTUPAK

Priloženi materijal: Fluid Thioglycollate Medium

Potreban materijal koji se nabavlja zasebno: Dodatne hranjive podloge, reagensi, organizmi za kontrolu kvalitete i laboratorijska oprema prema potrebi.

Postupak ispitivanja: Primjenjujte aseptične tehnike.

Prije upotrebe popustite čepove i stavite epruvete u kipuću vodu* na otprilike 5 min dok se podloga ne reducira (bezbojna). Zategnite čepove odmah nakon što ih maknete s izvora topline. Pričekajte da se podloga ohladi na sobnu temperaturu.

Za općenitu upotrebu inokulirajte uzorke direktno u podlogu i inkubirajte epruvete do 7 dana na 35 ± 2 °C.

Za ispitivanje sterilnosti treba slijediti preporuke USP-a³ i drugih kontrolnih agencija.¹¹ Ti referentni izvori navode omjer podloge na proizvodu koji treba koristiti u ispitivanjima sterilnosti kao i pojedinosti o prikupljanju uzoraka i interpretaciji ispitnih rezultata. Za ispitivanje sterilnosti vrlo je važno da se podloga u ispitnim posudama reducira na dovoljan stupanj kako bi se osigurala replikacija obaveznih anaeroba i mikroaerofilnih organizama. Ako ispitni uzorak napravi podlogu tako mutnom da se mikrobní rast ne može lako vidjeti, treba ga prebaciti u novu podlogu.

***NAPOMENA:** Upotreba mikrovalne pećnice ne preporučuje se.

Korisnička kontrola kvalitete: Pogledajte poglavlje „Postupci kontrole kvalitete“

Svaka serija podloga ispitana je pomoću odgovarajućih organizama za kontrolu kvalitete, a ta su ispitivanja, kada je to bitno, usklađena sa specifikacijama i standardima instituta CLSI. Kao i uvijek, ispitivanja za kontrolu kvalitete moraju se provoditi u skladu s važećim lokalnim, državnim, saveznim ili nacionalnim propisima, uvjetima akreditiranja i/ili standardnim postupcima kontrole kvalitete vašeg laboratorija.

Za određivanje pH vrijednosti podloge u epruveti potencijetrom treba koristiti jednu elektrodu dovoljno male veličine da stane u epruvetu. Vrh elektrode treba postaviti ispod površine podloge bujona.

X REZULTATI

Nakon inkubacije rast se očituje prisutnošću zamućenosti u usporedbi s neinokuliranom kontrolom. Striktni aerobi rastu u tankom sloju na površini bujona, obligatni anaerobi rastu samo u dijelu bujona ispod gornjeg oksidiranog (ružičastog) sloja. Pažljivo uklonite tekućinu s različitih razina, može se poboljšati sposobnost razdvajanja različitih vrsta miješanih kultura.

XI OGRANIČENJA POSTUPKA

Anaerobi mogu previše narasti zbog brzo rastućih fakultativnih organizama. Pregledajte i obojite bujon po Gramu ako na pločastoj podlozi ne bude rasta. Za izolaciju anaeroba nemojte se nikada oslanjati isključivo na kulture bujona. Neki anaerobi mogu se inhibirati metaboličkim proizvodima ili kiselinama za brzo rastuće fakultativne anaerobe.¹²

Hranjiva podloga ponekad sadrži mrtve organizme iz sastojaka podloge koji mogu biti vidljivi u razmazima hranjive podloge. Drugi izvori mrtvih mikroorganizama nakon bojenja po Gramu uključuju reagense bojenja, imerzijsko ulje, staklene pločice i uzorke koji se koriste za inokulaciju. U slučaju nesigurnosti u valjanost bojenja po Gramu, kultura se mora ponovno inkubirati još jedan do dva sata i ponovno ispitati prije davanja izvješća.

Za identifikaciju organizmi moraju biti u čistoj kulturi. Za konačnu identifikaciju potrebno je provesti morfološka, biokemijska i/ili serološka ispitivanja. U odgovarajućim poglavljima potražite detaljne informacije i preporučene postupke.^{9,10,13}

XII RADNA SVOJSTVA

Prije izdavanja ispitana su radna svojstva svih pakiranja tekuće tioglikolatne podloge. Prije inokulacije, reprezentativni uzorci pakiranja se reduciraju u kipućoj vodenoj kupelji tijekom otprilike 5 min. Nakon hlađenja treba inokulirati epruvete s 0,75 mL kultura vrsta *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 i 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 i ATCC 25923). Inokulati vrsta *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* razrjeđuju se tako da sadržavaju 100 ili manje jedinica koje stvaraju kolonije (CFU) po mL. Inokulum vrste *B. vulgatus* priprema se iz kolonija uzgojenih na pločicama anaerobnog krvnog agara CDC s 5% ovčje krvi i prilagođavaju se u tioglikolatnoj podlozi bez dekstroze i indikatora kako bi se dobilo 10 – 100 CFU/mL. Čepove treba zategnuti odmah nakon inokulacije za epruvete koje sadrže *B. fragilis* i *S. aureus*; čepovi ostalih epruveta ostaju djelomično odvijeni. Inkubirajte epruvete na 35 ± 2 °C. Epruvete koje sadrže *B. fragilis* i *S. aureus* (ATCC 25923) pokazuju tragove jakog rasta unutar 48 h inkubacije. Preostali organizmi pokazuju umjeren do jak rast u roku 3 dana inkubacije.

XIII DOSTUPNOST

Kat. br.	Opis
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, pakiranje od 10 epruveta veličine K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, pakiranje 100 epruveta veličine K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, pakiranje 100 epruveta veličine K (naljepnica ispisana na tintnom pisaču)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, pakiranje od 10 epruveta veličine A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, pakiranje 100 epruveta veličine A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, pakiranje 100 epruveta veličine A (naljepnica ispisana na tintnom pisaču)

XIV REFERENCE

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. 2009. The U.S. pharmacopeia 32/The national formulary 27. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
4. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry and M.A. Pfaller (ed.) 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
11. Horwitz, W. (ed.). 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed, vol.1. AOAC International, Gaithersburg, Md.
12. Reischelderfer and Mangels. 1992. In Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Tehnički servis i podrška na BD Diagnostics: obratite se lokalnom predstavniku tvrtke BD ili posjetite 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