



BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin



L007509 • Ред. 14 • Октябрь 2015 г.

МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА (Дополнительно)

I ВВЕДЕНИЕ

Тиогликолятная среда, обогащенная витамином K₁ и гемом Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin, предназначена для культивирования требовательных и нетребовательных к питательной среде микроорганизмов.

II МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ

1. Уменьшите среду, вскипятив* неплотно закрытые пробирки. После закипания незамедлительно затяните крышки на пробирках и дайте пробиркам остынуть до комнатной температуры.

***ПРИМЕЧАНИЕ.** Не рекомендуется использовать микроволновую печь.

2. Приготовление посевного материала

Используйте культуру обогащенной тиогликолятной среды (48 – 72 ч), среды измельченного мяса или колонии из чашки с анаэробным агаром CDC с 5 % овечьей крови, которая была перемещена в пробирку с заранее уменьшенной обогащенной тиогликолятной средой, и установите мутность 0,5 по стандарту Макфарланда.

3. С помощью стерильных калиброванных петлей 0,01 мл засевайте пробирки из стандартных посевных материалов для каждого микроорганизма.

4. Инкубируйте плотно закрытые пробирки при температуре 35 ± 2 °C в аэробной атмосфере.

5. Проверьте пробирки через 18 – 24 ч и через 42 – 48 ч на наличие роста.

6. Ожидаемые результаты

Микроорганизмы CLSI	ATCC	Выделение
* <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337	Рост
* <i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	Рост
* <i>Clostridium perfringens</i>	13124	Рост
Дополнительные микроорганизмы		
<i>Porphyromonas levii</i>	29147	Рост
<i>Clostridium novyi A</i>	7659	Рост

* Штамм микроорганизма, рекомендуемый для контроля качества.

III ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

1. Проверьте пробирки, как описано в разделе «Разложение продукта».

2. Визуально проверьте репрезентативные пробирки, чтобы убедиться в том, что существующие физические дефекты не будут препятствовать использованию.

3. Определите уровень pH потенциометрическим способом при комнатной температуре, чтобы убедиться в соответствии характеристикам 7,0 ± 0,2.

4. Выдерживайте незасеянные репрезентативные пробирки при температуре от 20 до 25 °C и от 30 до 35 °C и проверьте на наличие бактериального загрязнения через 7 дней.

СВЕДЕНИЯ О ПРОДУКТЕ

IV НАЗНАЧЕНИЕ

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (тиогликолятная среда, обогащенная витамином K₁ и гемом) — это среда общего назначения, используемая в методиках качественного анализа для культивирования требовательных и нетребовательных к питательной среде микроорганизмов, включая аэробные и анаэробные бактерии, полученные из различных клинических и неклинических материалов.

V КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ

Обогащенная тиогликолятная среда Enriched Thioglycollate Medium — это тиогликолятная среда **BBL** Thioglycollate Medium без индикатора Indicator-135C с добавлением витамина K₁ и гема. ¹⁻³ Насыщенная бульонная среда рекомендуется для использования при изоляции и культивировании требовательных к питательной среде или медленно растущих строгих анаэробных микроорганизмов, присутствующих в клинических материалах. ^{4,5} Она также рекомендуется для изоляции и культивации множества аэробных и факультативных анаэробных микроорганизмов. Среда готовится со свободным анаэробным пространством и поставляется в пробирках с завинченными крышками в соответствии с рекомендациями CDC. ⁴ Витамин K₁ и гемин необходимы для роста определенных анаэробных микроорганизмов. ^{6,7}

Изоляция микроорганизмов из клинических материалов часто требует использования насыщенной бульонной среды в дополнении к селективной, а дифференциальная и неселективная среда в чашках обычно используются для первичной изоляции. Использование жидкой резервной среды снижает возможность полной потери этиологического агента, который присутствует в малочисленных медленно растущих в чашке со средой микроорганизмов, восприимчивых к селективным агентам или чувствительных к неблагоприятным условиям инкубации, например недостаток анаэробии для оптимального роста строгих анаэробных микроорганизмов.

VI ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Натрия тиогликолят является восстановителем, который поддерживает низкое давление кислорода в среде. Витамин K₁ требуется для роста некоторых штаммов *Prevotella melaninogenica*⁶ и позволяет увеличить рост некоторых штаммов *Bacteroides* и грамположительных неспорообразующих микроорганизмов.⁸ Гемин является источником X-фактора, который стимулирует рост многих микроорганизмов.

VII РЕАГЕНТЫ

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Примерная рецептура* на литр очищенной воды

Панкреатический гидролизат казеина	17,0 г	Агар	0,7 г
Папаиновый гидролизат соевой муки	3,0 г	L-цистин	0,25 г
Декстроза	6,0 г	Сульфит натрия	0,1 г
Натрия хлорид	2,5 г	Гемин	0,005 г
Натрия тиогликолят	0,5 г	Витамин K ₁	0,001 г

* При необходимости изменяется и/или дополняется для соответствия критериям эффективности.

Предупреждения и меры предосторожности. Для диагностики *in vitro*.

При составлении отчетов о результатах непосредственного окрашивания по Граму и/или других непосредственных микробиологических окрашиваний для образцов тканей, обработанных с применением данной среды, следует соблюдать осторожность из-за возможного присутствия в среде культивирования нежизнеспособных микроорганизмов.

Пробирки с плотными крышками следует открывать осторожно, чтобы не разбить пробирку и не пораниться осколками.

В клинических образцах могут присутствовать патогенные микроорганизмы, в том числе вирус гепатита и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). При работе с образцами, загрязненными кровью или другими биологическими жидкостями, следует соблюдать стандартные меры предосторожности⁹⁻¹² и инструкции учреждения. После использования перед утилизацией стерилизуйте в автоклаве подготовленные пробирки, контейнеры для образцов и другие загрязненные материалы.

Условия хранения. После получения храните пробирки в темноте при температуре от 2 до 8 °C. Избегайте замораживания и перегрева. Открывайте непосредственно перед использованием. Сведите к минимуму воздействие света. Среда, хранящаяся в пробирках в соответствии с указаниями на этикетке, может быть засеяна до истечения срока годности и выдержана в течение рекомендуемого инкубационного периода. Перед посевом дайте среде нагреться до комнатной температуры.

Разложение продукта. При наличии признаков бактериального загрязнения, изменения цвета, высыхания или других признаков разложения продукта не используйте пробирки.

VIII ВЗЯТИЕ И ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ

Подходящие для культивирования образцы можно обрабатывать, используя различные методики. Подробную информацию см. в соответствующих документах.^{13,14} Образцы следует собирать до введения противомикробных средств. Необходимо обеспечить своевременную доставку в лабораторию.

IX МЕТОДИКА

Поставляемые материалы. Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Необходимые, но непоставляемые материалы. Требуется дополнительная питательная среда, реагенты, культуры микроорганизмов для контроля качества и лабораторное оборудование.

Методика тестирования. Соблюдайте асептическую методику работы.

Жидкие среды для анаэробной инкубации следует восстановить перед посевом, поместив неплотно закрытые пробирки на 18 – 24 ч в анаэробные условия. Эффективным и простым способом достижения необходимых анаэробных условий является использование анаэробной системы **BD GasPak EZ**. Жидкие среды можно также восстанавливать непосредственно перед использованием посредством кипячения* с неплотно закрытыми крышками и охлаждения до комнатной температуры с плотно закрытыми крышками перед посевом.

Засейте образец в требуемую среду сразу после его поступления в лабораторию. При работе с жидкими образцами среды в пробирках следует засеивать одним или двумя каплями образца. Образцы тканей следует порубить и протереть в стерильном восстановленном бульоне, например в обогащенной тиогликолятной среде Enriched Thioglycollate Medium, для культивирования микроорганизмов. После этого засеивание выполняется так же, как и для жидких образцов. После засеивания среды в чашках образцы мазков могут помещаться в бульон. Кроме того, тампон с мазком можно промыть в небольшом объеме стерильного восстановленного бульона, например в обогащенной тиогликолятной среде Enriched Thioglycollate Medium, после чего этот бульон используется для засева среды, как и в случае в жидкими образцами.

Образцы, для которых известно о наличии строгих анаэробных микроорганизмов или такое наличие подозревается, следует засеивать ближе ко дну пробирки. Инкубируйте пробирки с закрытыми крышками в аэробной атмосфере при температуре 35 ± 2 °C или другой подходящей температуре.

Перед регистрацией отрицательного результата культуры в бульоне следует хранить не менее 1 недели.¹⁵

***ПРИМЕЧАНИЕ.** Не рекомендуется использовать микроволновую печь.

Контроль качества. См. раздел «Методики контроля качества».

Все партии среды протестированы с использованием соответствующих микроорганизмов для контроля качества, и данное тестирование соответствует характеристикам продукта и стандартам CLSI, если таковые применимы. Как всегда, проводите тестирование контроля качества в соответствии с применимыми местными законами, законами штата или государственными законами, требованиями аккредитации и (или) методиками контроля качества, принятыми в лаборатории.

Для определения pH среды в пробирке потенциометрическим способом необходимо использовать один электрод, размер которого позволяет поместить его в пробирки. Кончик электрода необходимо поместить ниже поверхности бульонной среды.

X РЕЗУЛЬТАТЫ

Рост в пробирках с бульонной средой, такой как обогащенная тиогликолятная среда Enriched Thioglycollate Medium, определяется наличием помутнения по сравнению с незасеянной контрольной пробиркой.

При наличии роста культуры необходимо проверить с помощью окрашивания по Граму и выполнить их пересев в чашку с селективной и неселективной средой. При подозрениях на наличие анаэробных микроорганизмов субкультуры также необходимо обработать в среде чашки.

XI ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Рост факультативных микроорганизмов может проходить быстрее, чем рост анаэробных микроорганизмов. Если в среде отсутствует рост, проверьте бульон и выполните окрашивание по Граму. Никогда не анализируйте культуры бульона только на основании изоляции анаэробных микроорганизмов. Некоторые анаэробные микроорганизмы могут быть ингибированы продуктами метаболизма или кислотами, вырабатываемыми быстрорастущими факультативными микроорганизмами.¹⁵

Для идентификации должны использоваться микроорганизмы чистой культуры. Для окончательной идентификации необходимо выполнять морфологические, биохимические и (или) серологические тесты. Дополнительную информацию и рекомендованные методики см. в соответствующих документах.^{13,14,16}

Питательные среды иногда содержат погибшие микроорганизмы, принесенные вместе с компонентами среды, которые могут быть видны на мазках питательной среды. К другим источникам погибших микроорганизмов, видимых при окрашивании по Граму, относятся реагенты для окрашивания, иммерсионное масло, предметные стекла и образцы, используемые для засеивания. В случае неопределенности относительно достоверности результатов окрашивания по Граму культуру следует повторно инкубировать в течение одного или двух часов и повторить тест после получения отчета.

XII ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Перед выпуском все серии обогащенной тиогликолятной среды с витамином K₁ и геминем Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin проходят испытания на эффективность. Перед посевом репрезентативные образцы серии восстанавливаются посредством нагрева на водяной бане не менее 10 минут и охлаждения. С помощью калиброванной петли вместимостью 0,01 мл пробирки засевают культурами, которые были приведены в соответствие с уровнем 0,5 единиц по стандарту мутности Макфарланда. Посевной материал для *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) и *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) готовится из колоний, выращенных на чашках с анаэробным агаром CDC с 5 % овечьей крови CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar и приведенных к правильной концентрации посевного материала в предварительно восстановленной обогащенной тиогликолятной среде. Посевной материал для *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) берется из обогащенной тиогликолятной среды Thioglycollate Medium, Enriched, а для *C. novyi* A (ATCC 7659) — из глюкозного бульона с измельченным мясом Chopped Meat Glucose Broth, PR II. Пробирки засеваются ниже поверхности бульона, с наибольшим погружением в среду. Сразу же после засева крышки плотно завинчиваются, а затем пробирки инкубируются в аэробной атмосфере при 35 ± 2 °C. Пробирки проверяются на интенсивность роста через 18 – 24 ч и через 42 – 48 ч. Все микроорганизмы проявляют обильный рост через 48 ч.

XIII НАЛИЧИЕ

№ по каталогу	Описание
221742	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 5 мл
221787	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 мл
221788	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 мл
297292	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 10 мл

XIV СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Brewer, J.H. 1940. A clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobes. *J. Bacteriol.* 39:10.
2. Vera, H.D. 1944. Comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. *J. Bacteriol.* 47:59-65.
3. Dowell, V.R., Jr., and T.M. Hawkins. 1987. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. CDC laboratory manual. HHS Publication No. (CDC) 87-8272. Centers for Disease Control, Atlanta.
4. Dowell, V.R., Jr., G.L. Lombard, F.S. Thompson, and A.Y. Armfield. 1977. Media for isolation, characterization, and identification of obligately anaerobic bacteria. CDC laboratory manual. Center for Disease Control, Atlanta.
5. Forbes, B.A., and P.A. Granato. 1995. Processing specimens for bacteria, p. 265-281. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Gibbons, R.J. and J.B. MacDonald. 1960. Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.* 80:164-170.
7. Wilkins, T.D., S.L. Chalgren, F. Jimenez-Ulate, C.R. Drake, Jr., and J.L. Johnson. 1976. Inhibition of *Bacteroides fragilis* on blood agar plates and reversal of inhibition by added hemin. *J. Clin. Microbiol.* 3:359-363.
8. Finegold, S.M., V.L. Sutter, H.R. Attebery, and J.E. Rosenblatt. 1974. Isolation of anaerobic bacteria, p. 365-375. *In* E.H. Lennette, G.H. Spaulding, and J.P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
15. Reischelderfer, C., and J.I. Mangels. 1994. Culture media for anaerobes, p. 2.3.1-2.3.8. *In* H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
16. 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.

Служба технической поддержки BD Diagnostics: обращайтесь к местному представителю компании BD или на сайт 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