

МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА (Дополнительно)

I ВВЕДЕНИЕ

Fluid Thioglycollate Medium (жидкая тиогликолятная среда) — это среда общего назначения для культивирования анаэробных, микроаэрофильных и аэробных организмов, рекомендуемая как одна из сред для теста на биологическую стерильность.

II МЕТОДИКА ТЕСТИРОВАНИЯ

- Засейте репрезентативные образцы перечисленными далее культурами.
 - Перед использованием ослабьте крышки и поместите пробирки в кипящую воду* приблизительно на 5 минут до восстановления среды (обесцвечивания). После извлечения из горячей воды немедленно плотно закройте крышки. Дайте среде остыть до комнатной температуры.
***ПРИМЕЧАНИЕ.** Не рекомендуется использовать микроволновую печь.
 - Приготовьте раствор, содержащий 100 или менее КОЕ/мл, из 24–48-часовых культур, выращенных в среде **Trypticase** Soy Broth (триптиказо-соевый бульон) или Enriched Thioglycollate Medium (обогащенная тиогликолятная среда), для штаммов *Bacteroides* и *Clostridium*.
 - С помощью стерильных пипеток емкостью 1,0 мл засейте в пробирки по 0,75 мл растворов.
 - Инкубируйте пробирки с неплотно закрытыми крышками при температуре 30 – 35 °C в аэробной атмосфере, за исключением штаммов CLSI (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), которые следует инкубировать с плотно закрытыми крышками.
- Осмотрите пробирки с рекомендованными CLSI контрольными штаммами (плотно закрытые крышки) после 18 – 24 и 48 часов роста. Осматривайте другие контрольные штаммы (рекомендованные USP) в течение 3 дней на наличие роста.
- Ожидаемые результаты

Микроорганизмы CLSI	ATCC	Выделение
* <i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Рост
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Рост
Дополнительные микроорганизмы		
(Тест стимулирования роста USP)		
** <i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Рост
** <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Рост
** <i>Clostridium sporogenes</i>	11437	Рост
** <i>Clostridium sporogenes</i>	19404	Рост
** <i>Bacillus subtilis</i>	6633	Рост
** <i>Kocuria rhizophila</i>	9341	Рост
** <i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	Рост

* Штамм микроорганизма, рекомендуемый для контроля качества.

** Проверка роста для использования стерильных проверок USP.

III ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Проверьте пробирки, как описано в разделе «Разложение продукта».
- Визуально проверьте репрезентативные пробирки, чтобы убедиться в том, что существующие физические дефекты не будут препятствовать использованию.
- Определите уровень pH потенциометрическим способом при комнатной температуре, чтобы убедиться в соответствии характеристикам $7,1 \pm 0,2$.
- 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

Жидкая тиогликолятная среда соответствует спецификациям, приведенным в фармакопее США (*The United States Pharmacopeia, USP*).

Жидкая тиогликолятная среда (FTM) используется для тестов на биологическую стерильность и для культивирования анаэробных, аэробных и микроаэрофильных организмов.

V КРАТКИЙ ОБЗОР И ОПИСАНИЕ

Жидкая тиогликолятная среда была разработана Брюером (Brewer) для быстрого культивирования анаэробных и аэробных организмов.¹ Она была впервые получена в обезвоженной форме в биологической лаборатории Балтимора (Baltimore Biological Laboratory, BBL) в 1940 г. В 1944 г. Верой (Vera) был добавлен казеиновый пептон.²

Среда способна поддерживать хороший рост разнообразных нетребовательных микроорганизмов как патогенных, так и непатогенных видов. Помимо снижения потенциала окисления-восстановления тиогликолят натрия характеризуется способностью нейтрализовать антибактериальное действие соединений ртути. Эти характеристики делают среду FTM особенно полезной для определения присутствия заражения в биологических и других материалах. Формула BBL соответствует требованиям к проверке роста *USP*.³

Жидкую тиогликолятную среду можно использовать после ее приготовления до окисления приблизительно 30 % среды, на что указывает розовый цвет резазурина на поверхности. Если реакция окисления перешла эту границу, бульон можно повторно нагреть с помощью пара или кипящей воды, охладить и использовать.

VI ПРИНЦИПЫ МЕТОДИКИ

Декстроза, пептон, L-цистин и дрожжевой экстракт являются источниками факторов роста, необходимых для репликации бактерий. Хлорид натрия обеспечивает необходимые ионы. Тиогликолят натрия является восстановителем, который предотвращает накопление пероксидов, губительных для некоторых микроорганизмов. L-цистин также является восстановителем, поскольку он содержит сульфгидрильные группы, инактивирующие соединения тяжелых металлов и поддерживающие низкий окислительно-восстановительный потенциал, поддерживая таким образом анаэробизм. Резазурин является индикатором окисления-восстановления, который принимает розовый цвет при окислении и обесцвечивается при восстановлении. Небольшое количество агара помогает поддерживать низкий окислительно-восстановительный потенциал путем стабилизации среды против конвекционных течений, поддерживая таким образом анаэробизм в глубине среды.⁴ *USP* включает в состав жидкой тиогликолятной среды 5,5 г/л декстрозы. Формула **BBL** содержит безводную декстрозу (5,0 г/л).

VII РЕАГЕНТЫ

Fluid Thioglycollate Medium

Примерная рецептура* на литр очищенной воды

Панкреатический гидролизат казеина.....	15,0 г	Натрия хлорид	2,5 г
L-цистин	0,5 г	Натрия тиогликолят	0,5 г
Декстроза (безводная).....	5,0 г	Резазурин	0,001 г
Дрожжевой экстракт.....	5,0 г	Агар	0,75 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 любыми предметами, загрязненными кровью и другими биологическими жидкостями, соблюдайте правила, принятые в учреждении, а также стандартные меры предосторожности.⁵⁻⁸ После использования перед утилизацией стерилизуйте в автоклаве подготовленные пробирки, контейнеры для образцов и другие загрязненные материалы.

Условия хранения. После получения храните пробирки в темноте в соответствии с указаниями на этикетке. 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.^{9,10} Образцы следует собирать до введения противомикробных средств. Необходимо обеспечить своевременную доставку в лабораторию.

IX МЕТОДИКА

Поставляемые материалы. Fluid Thioglycollate Medium

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

Методика тестирования. Соблюдайте асептическую методику работы.

Перед использованием ослабьте крышки и поместите пробирки в кипящую воду* приблизительно на 5 минут до восстановления среды (обесцвечивания). После извлечения из горячей воды немедленно плотно закройте крышки. Дайте среде остыть до комнатной температуры.

При обычном применении засеьте образцы непосредственно на среду и инкубируйте пробирки до 7 дней при температуре 35 ± 2 °C.

При проверке стерильности необходимо следовать рекомендациям USP³ и различных контролирующих органов.¹¹ В справочных источниках указывается соотношение количеств среды и продукта для использования в тестах на стерильность, а также содержится подробная информация об отборе образцов и интерпретации результатов тестирования. При выполнении теста на стерильность важно, чтобы среда в тестируемых сосудах была достаточно восстановлена для обеспечения репликации строгих анаэробных и микроаэрофильных организмов. Если тестируемый образец вызывает такое помутнение среды, что рост микроорганизмов трудно различить, следует перенести образец в свежую среду.

***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 пробирку. Кончик электрода необходимо поместить ниже поверхности бульонной среды.

X РЕЗУЛЬТАТЫ

После инкубации, рост проявляется как помутнение по сравнению с незасеянной контрольной пробиркой. Строгие аэробные микроорганизмы склонны к разрастанию тонким слоем на поверхности бульона; строгие анаэробные организмы растут только в области бульона под верхним окисленным (розовым) слоем. При осторожном удалении жидкости с разных слоев можно улучшить возможность разделения различных видов в смешанной культуре.

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.¹²

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.

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.^{9,10,13}

XII ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Перед выпуском все серии жидкой обогащенной тиогликолятной среды Fluid Thioglycollate Medium проходят испытания на эффективность. Перед посевом репрезентативные образцы серии восстанавливаются путем нагревания на водяной бане в течение приблизительно 5 минут. После остывания пробирки в пробирки засеиваются 0,75 мл культур *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 и 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) и *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 и ATCC 25923). Посевные материалы для культур *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* разбавляются до концентрации не более 100 колониеобразующих единиц (КОЕ) на миллилитр. Посевной материал для культуры *B. vulgatus* готовится из колоний, выращенных в чашках с анаэробным агаром CDC с 5 % овечьей крови, путем регулировки в тиогликолятной среде без декстрозы и индикатора для получения концентрации 10 – 100 КОЕ/мл. Сразу же после посева крышки пробирок, содержащих *B. fragilis* и *S. aureus*, плотно закрываются, а крышки остальных пробирок остаются неплотно закрытыми. Пробирки инкубируются при температуре 35 ± 2 °C. В пробирках с культурами *B. fragilis* и *S. aureus* (ATCC 25923) наблюдается рост от следов до обильного после 48 часов инкубации. Остальные микроорганизмы проявляют умеренный или активный рост в течение 3 дней инкубации.

XIII НАЛИЧИЕ

№ по каталогу	Описание
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 мл, 10 пробирок размера К в упаковке
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 мл, 100 пробирок размера К в упаковке
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 мл, 100 пробирок размера К в упаковке (этикетка, напечатанная на струйном принтере)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 мл, 10 пробирок размера А в упаковке
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 мл, 100 пробирок размера А в упаковке
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 мл, 100 пробирок размера А в упаковке (этикетка, напечатанная на струйном принтере)

XIV СПРАВОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

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.

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