



BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin



L007509 • Rev. 14 • Oktober 2015

KVALITETSKONTROLPROCEDURER (Valgfrit)

I INDLEDNING

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (thioglycollat-medium, beriget med K₁-vitamin og hæmin) er et medium til generelle formål til dyrkning af kræsne og ikke-kræsne mikroorganismer.

II PROCEDURE FOR FUNKTIONSTEST

1. Reducer glassene med mediet ved at koge* med hæfterne løsne. Efter kogning skal hæfterne straks strammes, og glassene skal køle af til stuetemperatur.

*BEMÆRK: Brug af mikrobølgeovn anbefales ikke.

2. Klargøring af inokulum

Brug en 48- til 72-timers dyrkning af Enriched Thioglycollate Medium (beriget thioglycollat-medium), Chopped Meat Medium (hakket kød-medium) eller kolonier fra en plade med CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar (CDC anaerob 5 % fåreblodsagar), som er blevet overført til et på forhånd reduceret glas med Enriched Thioglycollate Medium (beriget thioglycollat-medium), og juster til en turbiditet, der svarer til en 0,5 McFarland-standard.

3. Ved hjælp af en 0,01 mL kalibreret løkke inokuleres glassene fra det standardiserede inokulum for hver organisme.
4. Inkuber glassene ved 35 ± 2 °C i en aerob atmosfære med strammede hæfter.
5. Undersøg glassene for vækst efter 18–24 timer og 42–48 timer.
6. Forventede resultater

CLSI-organismer	ATCC	Isolering
* <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337	Vækst
* <i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	Vækst
* <i>Clostridium perfringens</i>	13124	Vækst
Yderligere organismer		
<i>Porphyromonas levii</i>	29147	Vækst
<i>Clostridium novyi A</i>	7659	Vækst

*Anbefalet organismestamme til bruger kvalitetskontrol.

III YDERLIGERE KVALITETSKONTROL

1. Undersøg glas som beskrevet under "Produktforringelse".
2. Undersøg visuelt repræsentative glas for at sikre, at eventuelle eksisterende fysiske defekter ikke påvirker anvendelsen.
3. Kontrollér potentiometrisk ved rumtemperatur, at pH er inden for specifikationen 7,0 ± 0,2.
4. Inkubér ikke-inokulerede repræsentative glas ved 20 – 25 °C og 30 – 35 °C, og undersøg for mikrobiel kontaminering efter 7 dage.

PRODUKTOPLYSNINGER

IV TILSIGTET BRUG

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (thioglycollat-medium, beriget med K₁-vitamin og hæmin) er et medium til generelle formål, som anvendes i kvalitative procedurer eller til dyrkning af kræsne og ikke-kræsne mikroorganismer, herunder aerobe og anaerobe bakterier, fra en række forskellige kliniske og ikke-kliniske materialer.

V RESUMÉ OG FORKLARING

Enriched Thioglycollate Medium (beriget thioglycollat-medium) er **BBL** Thioglycollate Medium without Indicator-135C (thioglycollat-medium uden Indicator-135C) suppleret med K₁-vitamin og hæmin.¹⁻³ Det berigede bouillonmedium anbefales til isolation og dyrkning af kræsne eller langsomtvoksende, bundne anaerobe mikroorganismer, som findes i kliniske materialer.^{4,5} Det anbefales desuden til isolation og dyrkning af en lang række aerobe og fakultativt anaerobe mikroorganismer. Mediet klargøres med et anaerobt frirum og leveres i glas med skruelåg i henhold til CDC-anbefalinger.⁴ K₁-vitamin og hæmin har vist sig at være nødvendige for, at visse anaerobe organismer kan vokse.^{6,7}

Isolation af mikroorganismer fra kliniske materialer kræver ofte anvendelse af bouillonmedium ud over de selektive, forskelligartede og ikke-selektive plademedier, der normalt anvendes til primær rendyrkning. Brugen af flydende "backup"-medier mindsker risikoen for fuldkommen at overse et ætiologisk stof, som er til stede i lavt antal, vokser langsomt på plademediet, er påvirkeligt over for selektive stoffer eller følsomt over for ugunstige inkubationsforhold, dvs. utilstrækkeligt anaerobt liv til, at de bundne anaerobe organismer kan vokse optimalt.

VI PROCEDURENS PRINCIPPER

Natriumthioglycollat, som er et reducerende stof, bevarer en lav iltspænding i mediet. K₁-vitamin er påkrævet for vækst af nogle stammer af *Prevotella melaninogenica*⁸ og rapporteres at forbedre væksten af visse stammer af *Bacteroides*-arter og grampositive ikke-spordannere.⁸ Hæmin er kilden til den faktor X, som stimulerer væksten af mange mikroorganismer.

VII REAGENSER

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Omtrentlig formel* pr. liter rensset vand

Pankreatisk fordøjelse af casein	17,0 g	Agar	0,7 g
Papain-fordøjelse af sojabønneemel	3,0 g	L-cystin	0,25 g
Dextrose	6,0 g	Natriumsulfit	0,1 g
Natriumklorid	2,5 g	Hæmin	0,005 g
Natriumthioglycollat	0,5 g	K ₁ -vitamin	0,001 g

*Justeret og/eller suppleret, som krævet for at opfylde funktionskriterierne.

Advarsler og forholdsregler: Til *in vitro*-diagnostik.

Der skal udvises forsigtighed ved rapportering af resultater af direkte gramfarvning og/eller direkte mikrobiologisk farvning for vævsprøver, som er behandlet med dette medium, på grund af den mulige tilstedeværelse af ikke-levedygtige organismer i dyrkningsmediet.

Glas med stramme hætter skal åbnes forsigtigt for at undgå personskade pga. knust glas.

Patogene mikroorganismer, herunder hepatitisvira og humant immundefekt virus, kan forekomme i kliniske præparater.

"Standard forholdsregler"⁹⁻¹² og institutionelle retningslinjer skal følges ved håndteringen af alle materialer, der er kontamineret med blod og andre legems væsker. Sterilisér præparerede glas, prøvebeholdere og andre kontaminede materialer efter brug ved autoklavering, inden de bortskaffes.

Opbevaringsinstruktioner: Efter modtagelse opbevares glas i mørke ved 2 – 8 °C. Undgå nedfrysning og overophedning. Må ikke åbnes inden brugstidspunktet. Minimer udsættelsen for lys. Medier i glas, som har været opbevaret efter anvisningerne på etiketten indtil umiddelbart inden brug, kan inokuleres frem til udløbsdatoen og inkuberes i de anbefalede inkubationstidsrum. Lad mediet opnå stuetemperatur inden inokulering.

Produktforringelse: Glassene må ikke anvendes, hvis de viser tegn på mikrobiel kontaminering, misfarvning, udtørring eller andre tegn på forringelse.

VIII PRØVEINDSAMLING OG -HÅNDTERING

Præparater, der er egnet til dyrkning, kan håndteres med forskellige teknikker. Detaljerede oplysninger herom findes i de pågældende tekster^{13,14}. Prøver skal tages, inden behandling med antimikrobielle midler gives. Sørg for omgående levering til laboratoriet.

IX PROCEDURE

Vedlagte materialer: Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Nødvendige, ikke vedlagte materialer: Hjælpedyrkningsmedier, reagenser, organismer til kvalitetskontrol og nødvendigt laboratorieudstyr.

Testprocedure: Overhold aseptisk teknik.

Flydende medier til anaerob inkubering bør reduceres før inokulering ved at anbringe glassene med løsnede hætter under anaerobe forhold i 18 – 24 t før anvendelse. **BD GasPak EZ** anaerobe system er en effektiv og nem måde at opnå egnede anaerobe forhold på. Alternativt kan flydende medier reduceres umiddelbart før anvendelse ved kogning* med løse hætter og nedkøle dem til stuetemperatur med fastskruede hætter før inokulering.

Inokuler præparatet så hurtigt i det valgte vækstmedium som muligt efter modtagelse i laboratoriet. Med flydende prøver skal medier på glas inokuleres med en eller to dråber af prøven. Vævsprøver skal hakkes fint og kværnes i steril, reduceret bouillon, som f.eks. beriget thioglycollat-medium til dyrkning af mikroorganismer. Inokulering udføres herefter som for flydende prøver. Pødepindsprøver kan sættes i bouillon efter inokulering af medier på plade. Alternativt kan pødepinden "køres rundt" i en lille mængde steril, reduceret bouillon, som f.eks. Enriched Thioglycollate Medium (beriget thioglycollat-medium) og den bouillon, der anvendes til at inokulere mediet, som det udføres med flydende prøver.

Præparater, der er kendt for eller mistænkes for at indeholde obligate anaerobes, skal inokuleres i nærheden af glassets bund. Inkubér glassene med stramme hætter aerobt ved 35 ± 2 °C eller anden passende temperatur.

Bouillondyrkninger skal opbevares i mindst 1 uge, inden de bortskaffes som negative.¹⁵

*BEMÆRK: Brug af mikrobølgeovn anbefales ikke.

Bruger kvalitetskontrol: Se "Kvalitetskontrolprocedurer".

Hvert medieparti er blevet testet ved hjælp af passende kvalitetskontrolorganismer, og denne testning opfylder produktspecifikationerne og CLSI-standarderne, hvor det er relevant. Kvalitetskontroltestning skal som altid udføres i overensstemmelse med gældende lokale eller nationale regulativer, akkrediteringskrav og/eller laboratoriets standardkvalitetskontrolprocedurer.

En enkelt elektrode, som er så lille, at den passer ned i glassene, skal anvendes til at bestemme pH potentiometrisk af medier i glas. Elektrodens spids skal anbringes under overfladen af bouillonmedier.

X RESULTATER

Vækst i dyrkningsbouillon i glas, som f.eks. Enriched Thioglycollate Medium (beriget thioglycollat-medium), angives ved tilstedeværelse af uklarhed sammenlignet med en uinokuleret kontrol.

Hvis der forekommer vækst, skal dyrkninger undersøges vha. Gram-farvning og videredykning på selektive og ikke-selektive plademedier. Hvis anaerobes mistænkes, skal videredykninger på passende anaerobe plademedier foretages.

XI PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Anaerobes kan overgros af fakultative organismer, som vokser hurtigere. Undersøg og Gram-farv bouillon, hvis plademedit viser tegn på manglende vækst. Undgå udelukkende at afhænge af bouillon dyrkninger ved isolering af anaerobes. Visse anaerobes kan være hæmmet af metaboliske produkter eller syrer, som produceres af fakultative anaerobes, der vokser endnu hurtigere.¹⁵

Organismerne skal være i renkultur for at kunne identificeres. Der bør foretages morfologiske, biokemiske og/eller serologiske test for at få en endelig identifikation. Læs de relevante tekster for detaljerede oplysninger og anbefalede procedurer.^{13,14,16}

Dyrkningsmedier indeholder til tider døde organismer, der stammer fra mediet, og disse organismer kan være synlige i udstrøgne dyrkningsmedier. Andre kilder til døde organismer, som kan blive synlige ved gramfarvning, omfatter farvningsreagenser, immersionsolie, objektglas og de prøver, som anvendes til inokulation. Hvis der er tvivl om gramfarvnings validitet, skal dyrkningen inkuberes igen i en time eller to, hvorefter testen gentages, inden der afgives rapport.

XII FUNKTIONSDATA

Inden frigivelse testes alle partier af Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin for funktionsdata. Inden okulering reduceres repræsentative prøver af lottet ved, at de koges i vandbad i mindst 10 minutter og derefter afkøles. Ved hjælp af en 0,01 mL kalibreret løkke inokuleres glassene med kulturer, som er blevet justeret til en 0,5 McFarland-turbiditetsstandard. Inokulum for *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) og *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) klargøres fra kolonier, der er dyrket på plader med CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar (CDC anaerob 5 % fåreblodsagar) og justeret til den korrekte inokulumkoncentration i på forhånd reduceret Thioglycollate Medium, Enriched (thioglycollat-medium, beriget). Inokulum for *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) tages fra Thioglycollate Medium, Enriched (thioglycollat-medium, beriget), og inokulum for *C. novyi* A (ATCC 7659) tages fra Chopped Meat Glucose Broth, PR II (hakket kød-glukosebouillon, PR II). Glassene inokuleres under bouillonernes overflade så dybt nede i mediet som muligt. Hætteerne strammes straks efter inokulering, og glassene inkuberes aerobt ved 35 ± 2 °C. Glassene aflæses mht. mængden af vækst efter 18 – 24 timer og 42 – 48 timer. Alle organismer viser spor af kraftig vækst efter 48 timer.

XIII BESTILLING

Kat. nr.	Beskrivelse
221742	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 5 mL
221787	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 mL
221788	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 mL
297292	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 10 mL

XIV LITTERATUR

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. Attelbery, 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.

BD Diagnostics Teknisk service og support: skal De kontakte den lokale BD repræsentant eller besøg 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