

MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE (Optional)**I EINFÜHRUNG**

Flüssiges Thioglykollat-Medium ist ein Mehrzweckmedium zur Kultivierung von Anaerobiern, mikroaerophilen Organismen und Aerobiern; es wird als ein Medium für Sterilitätstests an Präparaten empfohlen.

II LEISTUNGSPRÜFUNG

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
 - a. Vor dem Gebrauch die Verschlusskappen lösen und die Röhrchen ca. 5 Min lang in kochendes Wasser* geben, bis das Medium reduziert (farblos) ist. Die Kappen sofort nach der Entnahme aus der Hitze wieder verschließen. Das Medium auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
***HINWEIS:** Die Verwendung von Mikrowellengeräten wird nicht empfohlen.
 - b. Von 24 bis 48 h alten **Trypticase**-Soja-Bouillonkulturen oder Kulturen auf angereicherten Thioglykollat-Medium für die Stämme *Bacteroides* und *Clostridium* eine Verdünnung mit max. 100 KBE/mL vorbereiten.
 - c. Die Röhrchen mit 0,75 mL der Verdünnungen mit sterilen 1,0-mL-Pipetten inokulieren.
 - d. Die Röhrchen mit lockeren Kappen in einer aeroben Atmosphäre bei 30 – 35 °C inkubieren, außer CLSI-Stämme (*Bacteroides fragilis*, ATCC 25285 und *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923), die mit verschlossenen Kappen inkubiert werden sollen.
2. Röhrchen mit den von der CLSI empfohlenen Kontrollstämmen (mit verschlossenen Kappen) nach 18 bis 24 und nach 48 h auf Wachstum überprüfen. Die Röhrchen der anderen Kontrollstämmen (von der USP empfohlen) bis zu 3 Tage lang auf Wachstum überprüfen.
3. Zu erwartende Ergebnisse

CLSI-Kontrollorganismen (ATCC-Stämme)
**Bacteroides fragilis* Wachstum
(25285)
**Staphylococcus aureus* Wachstum
(25923)

Weitere verwendete Stämme
(USP-Wachstumsförderungstest)
***Staphylococcus aureus* Wachstum
ATCC 6538
***Pseudomonas aeruginosa* Wachstum
ATCC 9027
***Clostridium sporogenes* Wachstum
ATCC 11437
***Clostridium sporogenes* Wachstum
ATCC 19404
***Bacillus subtilis* Wachstum
ATCC 6633
***Kocuria rhizophila* Wachstum
ATCC 9341
***Bacteroides vulgatus* Wachstum
ATCC 8482

* Empfohlener Stamm des Mikroorganismus zur Qualitätssicherung durch den Anwender.
** Zur Verifizierung der Wachstumsförderung bei USP-Sterilitätstests.

III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE

1. Röhrchen wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben begutachten.
2. Röhrchen stichprobenweise visuell auf Beschädigungen und Unregelmäßigkeiten überprüfen, um sicherzustellen, dass diese die spätere Nutzung nicht beeinträchtigen können.
3. Den pH-Wert mit dem Potentiometer bei Raumtemperatur darauf überprüfen, ob ein Bereich von $7,1 \pm 0,2$ eingehalten wird.
4. Nicht inokulierte Röhrchen stichprobenweise bei 20 – 25 °C und bei 30 – 35 °C inkubieren und nach 7 Tagen auf Kontamination durch Mikroorganismen überprüfen.

PRODUKTINFORMATIONEN

IV VERWENDUNGSZWECK

Flüssiges Thioglykolat-Medium entspricht den *USP*-Spezifikationen (*USP* = *United States Pharmacopeia*).

Flüssiges Thioglykolat-Medium (FTM) wird bei Sterilitätstests an Präparaten und zur Kultivierung von Anaerobiern, Aerobiern und mikroaerophilen Organismen verwendet.

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Flüssiges Thioglykolat-Medium wurde von Brewer zur schnellen Kultivierung von Anaerobiern sowie Aerobiern entwickelt.¹ Es wurde zunächst 1940 vom Baltimore Biological Laboratory (BBL) in dehydrierter Form zur Verfügung gestellt. Caseinpepton wurde dem Medium 1944 von Vera zugesetzt.²

Dieses Medium kann ein reiches Wachstum bei einer großen Vielzahl hochselektiver Organismen, sowohl pathogener als auch apathogener Spezies, fördern. Ein Merkmal von Natriumthioglykolat, zusätzlich zur Senkung des Redoxpotentials, ist seine Fähigkeit, die Antibiotika-Aktivität von quecksilberhaltigen Stoffen zu neutralisieren. Diese Eigenschaften von FTM sind besonders wertvoll beim Nachweis einer Kontamination in Präparaten und anderen Materialien. Die **BBL**-Rezeptur erfüllt die Anforderungen des *USP*-Wachstumsförderungstests.³

Flüssiges Thioglykolat-Medium kann nach der Vorbereitung so lange verwendet werden, bis ca. 30 % des Mediums oxidiert sind. Dies zeigt sich anhand der Rosafärbung des Resazurins an der Oberfläche. Ist der Oxidationsprozess weiter fortgeschritten, kann die Bouillon zum wiederholten Mal in Dampf oder kochendem Wasser erhitzt, abgekühlt und verwendet werden.

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Dextrose, Pepton, L-Cystin und Hefeextrakt liefern die für die bakterielle Replikation erforderlichen Wachstumsfaktoren. Natriumchlorid liefert essenzielle Ionen. Natriumthioglykolat ist ein Reduktionsmittel, das die Akkumulation des für einige Mikroorganismen letalen Peroxids reduziert. Das L-Cystin ist auch ein Reduktionsmittel, da es Sulfhydryl-Gruppen enthält, die Schwermetallverbindungen deaktivieren und für ein niedriges Redoxpotential sorgen und somit die Anaerobiose fördern. Resazurin ist ein Redoxindikator; wenn er oxidiert wird, zeigt er eine Rosafärbung, wenn er reduziert wird, ist er farblos. Die geringe Menge Agar unterstützt ein niedriges Redoxpotential, indem es das Medium gegen Konvektionsströme stabilisiert und somit eine Anaerobiose in den tieferen Schichten des Mediums gewährleistet.⁴ Die *USP* gibt 5,5 g/L Dextrose in der Rezeptur für flüssiges Thioglykolat-Medium an. Die **BBL**-Rezeptur enthält die wasserfreie Dextroseform (5,0 g/L).

VII REAGENZIEN

Fluid Thioglycollate Medium

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

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

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

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum.

Beim Berichten über die Ergebnisse von direkten Gramfärbungen und/oder anderen direkten mikrobiologischen Färbungen bei Gewebeproben, die mit diesem Medium verarbeitet wurden, sollte besondere Vorsicht angewandt werden, da möglicherweise nicht lebensfähige Organismen im Kulturmedium vorhanden sind.

Röhrchen mit fest sitzenden Verschlusskappen sind vorsichtig zu öffnen, um Verletzungen aufgrund von Glasbruch zu vermeiden.

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, darunter auch Hepatitis-Viren und HIV enthalten. Beim Umgang mit allen durch Blut oder andere Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“⁵⁻⁸ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Präparierte Röhrchen, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Aufbewahrung

Röhrchen nach Erhalt gemäß der Anleitung auf dem Etikett im Dunkeln lagern. Einfrieren und Überhitzen vermeiden. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. Gemäß der Kennzeichnung in Röhrchen aufbewahrte Medien können bis zum Verfallsdatum inokuliert und für die empfohlene Inkubationsdauer inkubiert werden. Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

Haltbarkeit des Produkts

Röhrchen bei Anzeichen von Kontamination durch andere Mikroorganismen, Verfärbung, Eintrocknen oder sonstigen Anzeichen von Produktverfall nicht verwenden.

VIII PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Kultivierbare Proben können auf unterschiedliche Weise gehandhabt werden. Detaillierte Informationen sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen.^{9,10} Die Probenentnahme sollte vor der Verabreichung von Antibiotika erfolgen. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

IX VERFAHREN**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial**

Fluid Thioglycollate Medium

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

Testverfahren

Antiseptische Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Vor dem Gebrauch die Verschlusskappen lösen und die Röhrchen ca. 5 Min lang in kochendes Wasser* geben, bis das Medium reduziert (farblos) ist. Die Kappen sofort nach der Entnahme aus der Hitze wieder verschließen. Das Medium auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Zur allgemeinen Verwendung die Proben direkt in das Medium inokulieren und bis zu 7 Tage bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren.

Für Sterilitätstests müssen die *USP*³-Empfehlungen und die Empfehlungen einer Vielzahl anderer Kontrollorganisationen befolgt werden.¹¹ 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. Für Sterilitätstests ist es wichtig, dass das Medium in den Testbehältern entsprechend reduziert wird, um die Replizierung obligater Anaerobier und mikroaerophiler Organismen sicherzustellen. Wenn die Testprobe das Medium so eintrübt, dass mikrobielles Wachstum nur schwer erkennbar ist, sollte die Probe auf ein frisches Medium transferiert werden.

***HINWEIS:** Die Verwendung von Mikrowellengeräten wird nicht empfohlen.

Qualitätssicherung durch den Anwender

Siehe „Qualitätskontrollverfahren“.

Jede Mediencharge wurde gemäß entsprechenden Qualitätskontrollorganismen getestet und dieser Test erfüllt die Produktspezifikationen und die zutreffenden CLSI-Standards. Wie immer sollten Qualitätskontrolltests unter Einhaltung der kommunal, landesweit und/oder bundesweit geltenden Vorschriften, der Zulassungsbestimmungen und/oder der Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen.

Eine Einzelelektrode, deren Durchmesser klein genug für die Röhrchen ist, sollte verwendet werden, um den pH-Wert von Medien in Röhrchen potentiometrisch zu ermitteln. Die Elektrodenspitze sollte unter der Oberfläche von Bouillonmedien platziert werden.

X ERGEBNISSE

Nach der Inkubation zeigt sich das Wachstum durch den Trübungsgrad im Vergleich zu einer nicht inokulierten Kontrolle. Strenge Aerobier neigen dazu, in einer dünnen Schicht an der Bouillonoberfläche zu wachsen; obligate Anaerobier wachsen nur in dem Teil der Bouillon, der sich unterhalb der oberen oxidierten (rosafarbenen) Schicht befindet. Durch sorgfältiges Entfernen der Flüssigkeit von den verschiedenen Spiegeln lässt sich die Trennung der unterschiedlichen Spezies in einer Mischkultur weiter verbessern.

XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Anaerobier können von schneller wachsenden fakultativen Organismen überwuchert werden. Die Bouillon untersuchen und gramfärben, wenn das Agarmedium kein Wachstum zeigt. Für die Isolierung von Anaerobiern nie ausschließlich auf Bouillonkulturen verlassen. Einige Anaerobier können durch metabolische Produkte oder Säuren von schneller wachsenden fakultativen Anaerobiern gehemmt werden.¹²

Kulturmedien enthalten gelegentlich abgestorbene Organismen, die in Ausstrichen von Nährmedien sichtbar sein können. Färbereagenzien, Immersionsöl, Objektträger (Glas) und die zur Inokulation verwendeten Proben können ebenfalls abgestorbene Organismen beherbergen, die durch Gramfärbung sichtbar werden. Falls Unsicherheit über die Gültigkeit der Gramfärbung besteht, sollte die Kultur eine oder zwei weitere Stunden inkubiert und der Test wiederholt werden, ehe ein Bericht erstellt wird.

Zum Nachweis müssen die Organismen in Reinkultur vorhanden sein. Für die endgültige Identifizierung sollten morphologische, biochemische oder serologische Tests durchgeführt werden. Detaillierte Informationen und empfohlene Verfahren sind der einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.^{9,10,13}

XII LEISTUNGSMERKMALE

Vor der Freigabe werden alle Chargen von flüssigem Thioglykolat-Medium auf ihre Leistungsmerkmale getestet. Vor der Inokulation werden Proben der Charge stichprobenweise durch etwa 5-minütiges Kochen in einem Wasserbad reduziert. Nach dem Abkühlen werden die Röhrchen mit 0,75 mL der Kulturen von *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 und ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 und ATCC 25923) inokuliert. Die Inokula für *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* werden so weit verdünnt, dass sie max. 100 koloniebildende Einheiten (KBE) pro mL enthalten. Das Inokulum für *B. vulgatus* wird aus Kolonien hergestellt, die auf anaerobem CDC-Agar mit 5 % Schafblut kultiviert und in Thioglykolat-Medium ohne Dextrose und Indikator eingestellt werden, um somit 10 – 100 KBE/mL zu ergeben. Die Kappen werden für Röhrchen, die *B. fragilis* und *S. aureus* enthalten, sofort nach der Inokulation verschlossen; die Kappen der restlichen Röhrchen werden gelöst. Die Röhrchen werden bei 35 ± 2 °C inkubiert. Röhrchen, die *B. fragilis* und *S. aureus* (ATCC 25923) enthalten, zeigen nach einer Inkubationszeit von 48 h Anzeichen für starkes Wachstum. Die übrigen Organismen zeigen innerhalb von 3 Tagen ein mäßiges bis starkes Wachstum.

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, Packung mit 10 Röhrchen der Größe K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, Karton mit 100 Röhrchen der Größe K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, Karton mit 100 Röhrchen der Größe K (Tintenstrahldrucker-Etikett)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, Packung mit 10 Röhrchen der Größe A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, Karton mit 100 Röhrchen der Größe A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, Karton mit 100 Röhrchen der Größe A (Tintenstrahldrucker-Etikett)

XIV 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. 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.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder 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