



PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI (Opcjonalnie)

I WPROWADZENIE

Fluid Thioglycollate Medium jest uniwersalnym podłożem do hodowli bakterii beztlenowych, mikroaerofilnych i tlenowych. Jest zalecany jako jedno z podłoży do badań sterylności materiałów biologicznych.

II PROCEDURA KONTROLI DZIAŁANIA

1. Podłoża zaszczenia się reprezentatywnymi próbkami wymienionych szczepów.
 - a. Przed użyciem należy poluzować nakrętki i umieścić probówki we wrzącej wodzie* na około 5 min tak, by doszło do redukcji podłoża (probówki powinny być bezbarwne). Po wyjęciu na podgrzane probówki natychmiast nałożyć nakrętki. Pozostawić podłoże do ostygnięcia w temperaturze pokojowej.
***UWAGA:** Nie zaleca się korzystania z kuchenki mikrofalowej.
 - b. Przygotować rozcieńczenia zawierające 100 lub mniej CFU/mL z 24- do 48-godzinnych hodowli szczepów *Bacteroides* i *Clostridium* na pożywce **Trypticase** Soy Broth lub Enriched Thioglycollate Medium.
 - c. Korzystając ze sterylnych pipet o objętości 1,0 mL, dokonać w probówkach posiewu rozcieńczenie 0,75 mL.
 - d. Inkubować probówki z poluzowanymi nakrętkami w temperaturze od 30 do 35°C w środowisku tlenowym, oprócz szczepów CLSI (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), które należy inkubować przy zakręconych nakrętkach.
2. Po upływie 18–24 h i po 48 h sprawdzić, czy w zalecanych kontrolnych probówkach szczepów CLSI (z zakręconymi nakrętkami) nastąpił wzrost. W ciągu 3 dni sprawdzić, czy nastąpił wzrost w probówkach innych szczepów kontrolnych (zalecane szczepy wzorcowe wg USP).
3. Oczekiwane wyniki
Gatunki kontrolne CLSI (szczepy wzorcowe ATCC)
**Bacteroides fragilis* Wzrost
(25285)
**Staphylococcus aureus*..... Wzrost
(25923)
Dodatkowe stosowane szczepy (Test pobudzenia wzrostu wg USP)
***Staphylococcus aureus* Wzrost
ATCC 6538
***Pseudomonas aeruginosa*..... Wzrost
ATCC 9027
***Clostridium sporogenes*..... Wzrost
ATCC 11437
***Clostridium sporogenes*..... Wzrost
ATCC 19404
***Bacillus subtilis* Wzrost
ATCC 6633
***Kocuria rhizophila* Wzrost
ATCC 9341
***Bacteroides vulgatus* Wzrost
ATCC 8482

* Szczep zalecany do przeprowadzania kontroli jakości przez użytkownika.

** Do sprawdzenia pobudzenia wzrostu do stosowania w badaniach sterylności wg USP.

III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

1. Ocenic próbki według opisu w dziale „Pogorszenie jakości produktu”.
2. Wzrokowo ocenic reprezentatywne próbki, aby upewnić się, że żadne istniejące wady fizyczne nie będą przeszkadzały w ich użytkowaniu.
3. Określić potencjometrycznie wartość pH w temperaturze pokojowej, aby upewnić się, że odczyn jest zgodny ze specyfikacją i wynosi $7,1 \pm 0,2$.
4. Inkubować reprezentatywne próbki bez wysianych drobnoustrojów w temperaturze od 20 do 25°C i od 30 do 35°C. Ocenic po 7 dniach pod względem zanieczyszczenia drobnoustrojami.

INFORMACJE O PRODUKCIE

IV PRZEZNACZENIE

Podłoże Fluid Thioglycollate Medium jest zgodne ze specyfikacją określoną w *Farmakopei Stanów Zjednoczonych (United States Pharmacopeia, USP)*.

Podłoże Fluid Thioglycollate Medium (FTM) jest używane do testów sterylności materiałów biologicznych oraz hodowli bakterii beztlenowych, tlenowych i mikroaerofilnych.

V STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIE

Podłoże Fluid Thioglycollate Medium zostało opracowane przez firmę Brewer na potrzeby szybkiej hodowli bakterii beztlenowych i tlenowych.¹ Po raz pierwszy wykorzystano je w postaci odwodnionej w laboratorium Baltimore Biological Laboratory (BBL) w 1940 roku. W 1944 roku Vera wprowadziła do składu pepton kazeinowy.²

Podłoże to umożliwia wzrost różnorodnych drobnoustrojów o wysokich wymaganiach odżywczych, zarówno gatunków patogennych, jak i niepatogennych. Tioglikolan sodu ma nie tylko zdolność zmniejszania potencjału oksydoredukcyjnego, ale także neutralizuje aktywność antybakteryjną związków rtęci. Te cechy podłoża FTM są szczególnie przydatne przy określaniu skażenia materiałów biologicznych i innych. Skład **BBL** spełnia wymagania testu pobudzenia wzrostu wg *USP*.³

Podłoże Fluid Thioglycollate Medium można wykorzystywać po uprzednim przygotowaniu w postaci utlenionej w około 30%. Wskazuje to różowy kolor resazurynu na powierzchni podłoża. Jeżeli doszło do silniejszego utlenienia, bulion można ponownie podgrzać w parze lub wrzącej wodzie, schłodzić i stosować.

VI ZASADA PROCEDURY

Źródłem czynników wzrostu niezbędnych do replikacji bakterii są dekstroza, peptony, L-cysteina oraz wyciąg drożdżowy. Chlorek sodu dostarcza niezbędnych jonów. Tioglikolan sodu jest czynnikiem redukującym, który zapobiega gromadzeniu nadtlenu śmiertelnych dla niektórych drobnoustrojów. Czynnikiem redukującym jest również L-cystyna, ponieważ zawiera grupy sulfhydrylowe, które dezaktywują związki metali ciężkich oraz utrzymują niski potencjał redukujący, wspomagając reakcje w warunkach beztlenowych. Resazuryn jest wskaźnikiem utleniania–redukcji. Ma barwę różową w stanie utlenionym i jest bezbarwny w stanie zredukowanym. W utrzymaniu niskiego potencjału redukcyjnego uczestniczy niewielka ilość agaru, który stabilizuje podłoże przed prądami konwekcyjnymi i utrzymuje warunki beztlenowe w głębszych partiach podłoża.⁴ W skład podłoża Fluid Thioglycollate Medium zgodnie z *Farmakopeą Stanów Zjednoczonych* wchodzi 5,5 g/L dekstrozy. Skład wg **BBL** zawiera dekstrozę bezwodną (5,0 g/L).

VII ODCZYNNIKI

Fluid Thioglycollate Medium

Przybliżony skład* w przeliczeniu na 1 litr wody oczyszczonej

Trzustkowy hydrolizat kazeiny	15,0	g
L-cystyna	0,5	g
Dekstroza (bezwodna)	5,0	g
Wyciąg drożdżowy	5,0	g
Chlorek sodu	2,5	g
Tioglikolan sodu	0,5	g
Resazuryln	0,001	g
Agar	0,75	g

*Skorygowany i/lub uzupełniony zgodnie z wymaganiami kryteriów działania.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*.

Podczas zgłaszania wyników bezpośredniego barwienia metodą Grama i/lub wyników bezpośredniego barwienia innymi metodami mikrobiologicznymi próbek tkankowych obrabianych z zastosowaniem tego podłoża należy zachować ostrożność ze względu na możliwą obecność martwych drobnoustrojów w podłożu.

Probówki z ciasno dopasowanymi zatyczkami należy otwierać ostrożnie, aby uniknąć obrażeń spowodowanych pęknięciem szkła.

W próbkach klinicznych mogą być obecne drobnoustroje chorobotwórcze, takie jak wirusy zapalenia wątroby i wirus HIV. Podczas pracy z materiałami skażonymi krwią i innymi płynami ustrojowymi należy przestrzegać zaleceń zawartych w „Standardowych środkach ostrożności”⁵⁻⁸ oraz wytycznych obowiązujących w danym laboratorium. Po wykorzystaniu gotowe probówki, pojemniki na próbki oraz inne materiały skażone należy przed wyrzuceniem poddać sterylizacji w autoklawie.

Instrukcja przechowywania

Po otrzymaniu należy przechowywać probówki w ciemności zgodnie z wytycznymi na etykiecie. Nie zamrażać i nie przegrzewać. Otwierać dopiero bezpośrednio przed użyciem. Ograniczać do minimum kontakt ze światłem. W podłożach przechowywanych do momentu użycia w probówkach, zgodnie z instrukcjami podanymi na etykiecie, można wykonywać posiewy do dnia określonego terminem ważności, a następnie prowadzić inkubację przez zalecany czas. Przed posiewem ogrzać podłoże do temperatury pokojowej.

Pogorszenie jakości produktu

Nie używać probówek, jeżeli są widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia lub inne, świadczące o pogorszeniu jakości.

VIII POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

Próbki przeznaczone do hodowli można przygotowywać różnymi technikami. Szczegółowe informacje można znaleźć w stosownej literaturze.^{9,10} Probki należy pobrać przed podaniem środków przeciwbakteryjnych. Konieczne jest zapewnienie szybkiej dostawy do laboratorium.

IX PROCEDURA

Dostarczane materiały

Podłoże Fluid Thioglycollate Medium

Materiały wymagane, ale niedostarczane

Pomocnicze pożywki hodowlane, odczynniki, szczepy do kontroli jakości i wyposażenie laboratoryjne zgodnie z wymaganiami.

Procedura testowa

Stosować techniki aseptyczne.

Przed użyciem poluzować nakrętki i umieścić probówki we wrzącej wodzie* na około 5 min, tak aby doszło do redukcji podłoża (probówki powinny być bezbarwne). Po wyjęciu na

podgrzane próbki natychmiast nałożyć nakrętki. Pozostawić podłoże do ostygnięcia w temperaturze pokojowej.

Przy zastosowaniu do celów podstawowych wykonać posiewy bezpośrednio na podłoże i inkubować próbki do 7 dni w temperaturze $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Przy zastosowaniu do celów testowania sterylności należy przestrzegać zaleceń *Farmakopei Stanów Zjednoczonych*³ i odpowiednich urzędów kontrolnych.¹¹ Te źródła referencyjne określają ilość podłoża, jaką należy wykorzystać w testach sterylności, oraz podają szczegóły pobierania próbek i interpretacji wyników. Podłoże w naczyniach testowych stosowanych w celu badania sterylności powinno być odpowiednio zredukowane, zapewniając replikację bezwzględnych beztlenowców i drobnoustrojów mikroaerofilnych. Jeśli w próbce testowej podłoże staje się mętne i nie można obserwować wzrostu drobnoustrojów, należy przenieść szczepy na świeże podłoże.

***UWAGA:** Nie zaleca się korzystania z kuchenki mikrofalowej.

Kontrola jakości przez użytkownika

Zobacz „Procedury kontroli jakości”.

Każda partia podłoża została przetestowana przy użyciu odpowiednich drobnoustrojów do kontroli jakości. Ten rodzaj testowania jest zgodny ze specyfikacją produktu i standardami CLSI, jeśli mają zastosowanie. Jak zwykle, testy należy wykonać zgodnie z obowiązującymi wymogami kontroli jakości, wynikającymi z przepisów miejscowych, stanowych, federalnych lub krajowych, wymogami akredytacji i/lub rutynowymi procedurami kontroli jakości w danym laboratorium.

Aby określić pH podłoża próbki metodą potencjometryczną, należy wykorzystać pojedynczą elektrodę o odpowiednio niewielkich rozmiarach dopasowanych do próbek. Końcówka elektrody powinna się znajdować poniżej powierzchni bulionu.

X WYNIKI

Po przeprowadzeniu inkubacji wzrost jest widoczny jako zmętnienie w porównaniu z niezaszczepioną kontrolą. Tlenowce bezwzględne zazwyczaj rosną w postaci cienkiej warstwy na powierzchni bulionu; beztlenowce obligatoryjne rosną jedynie w tej części pożywki bulionowej, która znajduje się poniżej górnej, utlenionej (różowej) warstwy. Ostrożnie usuwając ciecz z różnych warstw, można zwiększyć zdolność odseparowania poszczególnych gatunków w mieszaninie hodowli.

XI OGRANICZENIA PROCEDURY

Wzrost bakterii beztlenowych może być stłumiony przez szybciej rosnące drobnoustroje fakultatywne. Jeżeli na podłożu na płytkach nie obserwuje się wzrostu, należy ocenić bulion i dokonać jego barwienia metodą Grama. Przy izolacji beztlenowców nie należy nigdy polegać wyłącznie na hodowlach bulionowych. Wzrost niektórych beztlenowców może zostać zahamowany przez produkty metabolizmu lub kwasy produkowane przez szybciej rosnące beztlenowce fakultatywne.¹²

Podłoża hodowlane zawierają czasami martwe organizmy pochodzące ze składników podłoża, które mogą być widoczne w rozmazach z podłoża hodowlanych. Do innych źródeł martwych organizmów widocznych po zabarwieniu metodą Grama należą barwniki, olejki imersyjne, fragmenty szkła oraz próbki stosowane do posiewu. W przypadku niepewności związanej z prawidłowością barwienia metodą Grama należy przeprowadzić ponowną inkubację hodowli przez kolejną godzinę lub dwie, a następnie powtórzyć test przed wydaniem wyniku.

Do identyfikacji niezbędne są czyste kultury drobnoustrojów. W celu ostatecznej identyfikacji należy przeprowadzić badania morfologiczne, biochemiczne i/lub serologiczne. Szczegółowe informacje i opisy zalecanych procedur można znaleźć w stosownej literaturze.^{9,10,13}

XII CHARAKTERYSTYKA WYNIKÓW

Przed dopuszczeniem do obrotu wszystkie serie podłoża Fluid Thioglycollate Medium sprawdza się pod względem ich skuteczności. Przed posiewem reprezentatywne próbki serii

są redukowane poprzez gotowanie w łaźni wodnej przez ok. 5 min. Po schłodzeniu probówki są szczepione 0,75 mL hodowli *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 i ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 i ATCC 25923). Posiewy *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* i *S. aureus* są rozcieńczane tak, by zawierały 100 lub mniej jednostek tworzących kolonie (Colony Forming Units, CFU) w 1 mL. Posiew *B. vulgatus* jest przygotowywany z kolonii rosnących na płycie CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar i dostosowany za pomocą podłoża Thioglycollate Medium bez dekstrozy i wskaźnika w celu uzyskania 10 do 100 CFU/mL. Na probówki zawierające bakterie *B. fragilis* i *S. aureus* natychmiast po wykonaniu posiewu należy nałożyć nakrętki. Nakrętki pozostałych probówek pozostają poluzowane. Probówki są inkubowane w temperaturze 35 ± 2 °C. Probówki zawierające bakterie *B. fragilis* i *S. aureus* (ATCC 25923) w ciągu 48 godz. wykazują wzrost śladowy, przechodzący do intensywnego. Pozostałe drobnoustroje wykazują wzrost umiarkowany do intensywnego przed upływem 3 dni inkubacji.

XIII DOSTĘPNOŚĆ

Nr kat.	Opis
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, opakowanie zawierające 10 probówek typu K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, pudełko zawierające 100 probówek typu K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, pudełko zawierające 100 probówek typu K (etykieta z nadrukiem natryskowym)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, opakowanie zawierające 10 probówek typu A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, pudełko zawierające 100 probówek typu A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, pudełko zawierające 100 probówek typu A (etykieta z nadrukiem natryskowym)

XIV PIŚMIENNICTWO

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.

Dział Obsługi Technicznej firmy BD Diagnostics: należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem BD lub odwiedzić stronę 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