

PROCEDURI PENTRU CONTROLUL DE CALITATE (Opțional)

I INTRODUCERE

Fluid Thioglycollate Medium (mediul thioglicolat lichid) este un mediu de cultură de uz general pentru organismele anaerobe, microaerofile și aerobe și este recomandat ca unul din mediile pentru testarea sterilității probelor biologice.

II PROCEDURA TESTULUI DE PERFORMANȚĂ

- Inoculați eșantioane reprezentative în culturile enumerate mai jos.
 - Înainte de utilizare, slăbiți capacele și introduceți flacoanele în apă fiartă* timp de circa 5 min până când mediul este redus (incolor). Strângeți capacele imediat după luarea flacoanelor de pe foc. Lăsați mediul să se răcească la temperatura camerei.
***NOTĂ:** Nu este recomandată utilizarea unui cuptor cu microunde.
 - Din culturi de 24 – 48 h pe plăci de **Trypticase** bulion de soia sau mediu thioglicolat îmbogățit pentru tulpini *Bacteroides* și *Clostridium*, preparați o diluție care conține 100 UFC/mL sau mai puțin.
 - Utilizând pipete sterile de 1,0 mL, inoculați flacoanele cu 0,75 mL de diluții.
 - Incubați flacoanele cu capacele desfăcute la 30 – 35°C în atmosferă aerobă cu excepția tulpinilor CLSI (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), care trebuie incubate cu capacele închise.
- Examinați flacoanele cu tulpinile recomandate CLSI (capace închise) la 18 – 24 și 48 h, pentru a detecta semnele de creștere. Examinați flacoanele cu celelalte tulpini de control (recomandate USP) timp de până la 3 zile, pentru a detecta semnele de creștere.

3. Rezultate estimate

Organisme CLSI	ATCC	Recuperare
* <i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Creștere
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Creștere
Organisme suplimentare		
(Test de promovare a creșterii USP)		
** <i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Creștere
** <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Creștere
** <i>Clostridium sporogenes</i>	11437	Creștere
** <i>Clostridium sporogenes</i>	19404	Creștere
** <i>Bacillus subtilis</i>	6633	Creștere
** <i>Kocuria rhizophila</i>	9341	Creștere
** <i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	Creștere

*Tulpină recomandată pentru controlul calității efectuat de utilizator.

**Pentru verificarea promovării creșterii pentru utilizarea în testul de sterilitate USP.

III CONTROLUL SUPLIMENTAR DE CALITATE

- Examinați flacoanele și sticlele așa cum este descris în „Deteriorarea produsului”.
- Examinați vizual flacoanele reprezentative pentru a vă asigura că eventualele defecte fizice nu împiedică în utilizare.
- Determinați pH-ul la temperatura camerei prin metoda potențimetrică în scopul respectării specificațiilor de pH 7,1 ± 0,2.
- Incubați flacoanele reprezentative neinoculate la 20 – 25°C și 30 – 35°C și examinați după 7 zile pentru a detecta contaminarea microbiană.

INFORMAȚII DESPRE PRODUS

IV UTILIZARE SPECIFICĂ

Fluid Thioglycollate Medium este în conformitate cu specificațiile din *farmacopeea Statelor Unite (USP)*.

Fluid Thioglycollate Medium (FTM) este utilizat pentru testarea sterilității probelor biologice și pentru cultivarea organismelor anaerobe, aerobe și microaerofile.

V REZUMAT ȘI EXPLICAȚII

Fluid Thioglycollate Medium a fost creat de Brewer pentru cultivarea rapidă a organismelor anaerobe și aerobe.¹ Pentru prima dată a fost scos pe piață în formă deshidratată de către Baltimore Biological Laboratory (BBL) în 1940. Incorporarea peptonei din cazeină a fost realizată de Vera în 1944.²

Acest mediu este capabil să susțină o creștere bună pentru o mare varietate de microorganisme pretențioase, atât din specii patogene cât și non-patogene. O caracteristică a thioglicolatului de sodiu, pe lângă reducerea potențialului de oxidoreducere, este capacitatea sa de a neutraliza activitatea antibacteriană a compușilor pe bază de mercur. Aceste caracteristici desemnează FTM ca fiind extrem de adecvat în determinarea prezenței contaminanților în materialele biologice și de altă natură. Formula BBL îndeplinește cerințele de testare a promovării creșterii ale USP.³

Fluid Thioglycollate Medium poate fi utilizat după preparare până la oxidarea unei cantități de aproximativ 30% din mediu, așa cum este indicat de colorarea în roz a resazurinei de la suprafață. Dacă oxidarea a continuat, bulionul poate fi reîncălzit o dată în abur sau apă în fierbere, apoi răcit și reutilizat.

VI PRINCIPIILE PROCEDURII

Dextroza, peptona, L-cistina și extractul de drojdie asigură factorii de creștere necesari pentru replicarea bacteriană. Clorura de sodiu asigură ioni esențiali. Thioglicolatul de sodiu este un agent reducător care previne acumularea peroxizilor letali pentru unele microorganisme. L-cistina este de asemenea un agent reducător, conținând grupări sulfhidrice care inactivează compușii pe bază de metale grele și mențin un potențial redox redus, susținând astfel anaerobioza. Resazurina este un indicator de oxido-reducere, fiind roz la oxidare și incolor la reducere. Cantitatea redusă de agar contribuie la menținerea unui potențial redox redus, prin stabilizarea mediului împotriva curenților de convecție, menținând astfel anaerobioza la adâncimile maxime ale mediului.⁴ USP listează 5,5 g/L de dextroză în formula pentru Fluid Thioglycollate Medium. Formula BBL conține forma anhidră a dextrozei (5,0 g/L).

VII REACTIVI

Fluid Thioglycollate Medium

Formulă aproximativă* pentru un litru de apă purificată

Extract pancreatic de cazeină	15,0 g	Clorură de sodiu	2,5 g
L-cistină	0,5 g	Thioglicolat de sodiu	0,5 g
Dextroză (anhidră)	5,0 g	Resazurină	0,001 g
Extract de drojdie	5,0 g	Agar	0,75 g

*Ajustată și/sau suplimentată după cum este necesar pentru a îndeplini criteriile de performanță.

Avertismente și precauții: În scopul diagnosticului *in vitro*.

Este necesară o atenție sporită la raportarea colorației Gram directe și/sau a rezultatelor obținute în urma altor metode de colorație microbiologică directă pe probe de țesut procesate cu acest mediu, datorită posibilei prezențe a unor organisme neviabile în mediul de cultură.

Flacoanele cu capace bine fixate trebuie deschise cu atenție pentru a evita rănirea ca urmare a spargerii sticlei.

În probele clinice pot fi prezente microorganisme patogene, inclusiv virusurile hepatice și virusul imunodeficienței umane. La manevrarea articolelor contaminate cu sânge sau cu alte lichide biologice trebuie respectate „Precauțiile standard”⁵⁻⁸ și regulamentul instituției. Flacoanele preparate, recipientele pentru probe și celelalte materiale contaminate trebuie sterilizate prin autoclavare după utilizare, înainte de a fi aruncate.

Instrucțiuni de depozitare: La recepție, depozitați flacoanele la întuneric, conform instrucțiunilor de pe etichetă. Evitați congelarea sau supraîncălzirea. Deschideți numai înainte de utilizare. Reduceți la minimum expunerea la lumină. Mediile ambalate în flacoane păstrate până la utilizare în condițiile specificate pe etichetă pot fi inoculate până la data de expirare și incubate pentru duratele recomandate de incubare. Lăsați mediul să ajungă la temperatura camerei înainte de inoculare.

Deteriorarea produsului: Nu utilizați flacoanele dacă prezintă semne de contaminare microbiană, decolorare, deshidratare, fisuri sau alte semne de deteriorare.

VIII COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBELOR

Problele adecvate pentru cultivare pot fi manevrate utilizând tehnici variate. Pentru informații detaliate consultați textele corespunzătoare.^{9,10} Probele trebuie obținute înainte de administrarea agenților antimicrobieni. Trebuie să se asigure livrarea promptă la laborator.

IX PROCEDURA

Materiale furnizate: Fluid Thioglycollate Medium

Materiale necesare, dar nefurnizate: Medii de cultură auxiliare, reactivi, organisme pentru controlul de calitate și echipamentul de laborator necesar.

Procedura de testare: Respectați tehnicile de asepsie.

Înainte de utilizare, slăbiți capacele și introduceți flacoanele în apă fiartă* timp de circa 5 min până când mediul este redus (incolor). Strângeți capacele imediat după luarea flacoanelor de pe foc. Lăsați mediul să se răcească la temperatura camerei.

Pentru uz general, inoculați probele direct în mediu și incubați flacoanele până la 7 zile la 35 ± 2°C.

Pentru testarea sterilității trebuie urmate recomandările USP³ și ale diferitelor agenții de control.¹¹ Aceste surse de referință specifică raportul mediu – produs care trebuie utilizat în testele de sterilitate precum și detaliile de prelevare a probelor și de interpretare a rezultatelor testului. În scopul testării sterilității, este important ca mediul din recipientele de testare să fie redus într-un grad suficient pentru a asigura replicarea anaerobilor stricți și a organismelor microaerofile. Dacă proba de testare face mediul atât de tulbure încât creșterea microbiană nu poate fi recunoscută cu ușurință, se va efectua transferul în mediu proaspăt.

***NOTĂ:** Nu este recomandată utilizarea unui cuptor cu microunde.

Controlul calității efectuat de utilizator: Consultați „Proceduri pentru controlul de calitate”.

Fiecare lot de medii a fost testat prin utilizarea de organisme corespunzătoare pentru controlul de calitate, această testare îndeplinind cerințele din specificațiile produsului și standardele CLSI, în măsura în care acestea sunt relevante. La fel ca întotdeauna, testarea de control al calității trebuie efectuată conform reglementărilor în vigoare la nivel local, statal, federal sau național, conform cerințelor de acreditare și/sau procedurilor de laborator standard pentru controlul de calitate.

Pentru a determina potențiometric valoarea pH a mediului din flacon, trebuie utilizat un electrod individual cu o dimensiune suficient de mică încât să încapă în flacon. Vârful electrodului trebuie introdus până sub suprafața mediului de bulion.

X REZULTATE

După incubare, creșterea este evidențiată prin prezența turbidității în comparație cu o probă martor neinoculată.

Microorganismele aerobe stricte au tendința de a crește într-un strat subțire la suprafața bulionului; organismele anaerobe stricte vor crește pe acea porțiune a bulionului aflată sub stratul superior oxidat (roz). Prin îndepărtarea cu grijă a lichidului de la diferite nivele, este posibilă stimularea capacității de separare a diferitelor specii într-o cultură mixtă.

XI LIMITĂRILE PROCEDURI

Organismele anaerobe pot fi invadate de organismele facultative, care prezintă o creștere mai rapidă. Examinați și colorați Gram bulionul în cazul în care mediul de pe placă nu prezintă semne de creștere. Nu vă bazați niciodată numai pe culturile de bulion pentru izolarea anaerobilor. Unele organisme anaerobe pot fi inhibitate de produșii metabolici sau acizii generați din creșterea mai rapidă a organismelor anaerobe facultative.¹²

Mediile de cultură conțin uneori organisme moarte derivate din constituenții mediului, care pot fi vizibile pe frotiurile din mediile de cultură. Alte surse de organisme moarte vizibile prin colorația Gram includ reactivii de colorare, ulei de imersie, lamele de sticlă și probele utilizate pentru inoculare. Dacă apar incertitudini în ceea ce privește validitatea colorației Gram, cultura trebuie reincubată pentru încă o oră sau două și testul trebuie repetat înainte de emiterea raportului.

Pentru a fi identificate, microorganismele trebuie să provină din culturi pure. Pentru identificarea finală trebuie efectuate teste morfologice, biochimice și/sau serologice. Pentru informații detaliate și proceduri recomandate consultați textele corespunzătoare.^{9,10,13}

XII CARACTERISTICI DE PERFORMANȚĂ

Înainte de scoaterea pe piață, toate loturile de Fluid Thioglycollate Medium sunt testate în ceea ce privește caracteristicile de performanță ale produsului. Înainte de inoculare, eșantioane reprezentative ale lotului sunt reduse prin fierbere în baie de apă pentru circa 5 min. După răcire, flacoanele sunt inoculate cu 0,75 mL de culturi din speciile *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 și 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) și *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 și ATCC 25923). Probele de inocul pentru *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* și *S. aureus* sunt diluate pentru a conține 100 sau mai puține unități formatoare de colonii (UFC) pe mL. Inoculul pentru *B. vulgatus* este preparat din colonii crescute pe plăci cu agar sânge de oaie 5% CDC anaerob și sunt ajustate în mediu thioglicolat fără dextroză și indicator pentru a obține 10–100 UFC/mL. Capacele sunt strânse imediat după inocularea flacoanelor care conțin *B. fragilis* și *S. aureus*; capacele celorlalte flacoane sunt lăsate desfăcute. Flacoanele sunt incubate la $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Flacoanele care conțin *B. fragilis* și *S. aureus* (ATCC 25923) indică urme de creștere puternică la incubarea de 48 h. Organismele rămase prezintă creștere moderată până la puternică la incubarea timp de 3 zile.

XIII DISPONIBILITATE

Nr. cat.	Descriere
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, pachet cu 10 flacoane mărimea K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, cutie cu 100 flacoane mărimea K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, cutie cu 100 flacoane mărimea K (etichetă cu jet de cerneală)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, pachet cu 10 flacoane mărimea A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, cutie cu 100 flacoane mărimea A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, cutie cu 100 flacoane mărimea A (etichetă cu jet de cerneală)

XIV REFERINȚE

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.

Service Tehnic și Suport BD Diagnostics: contactați reprezentantul local BD sau 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