



BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin L007509 • Rev. 14 • Oktober 2015



MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE (Optional)

I EINFÜHRUNG

Thioglycollate Medium, angereichert mit Vitamin K₁ und Häm, ist ein Mehrzweckmedium für die Kultivierung von hochselektiven und nichtselektiven Mikroorganismen.

II LEISTUNGSPRÜFUNG

1. Röhrcchen mit dem Medium durch Kochen* reduzieren. Dabei müssen die Verschlusskappen gelöst sein. Nach dem Kochen die Verschlusskappen sofort wieder festdrehen und die Röhrcchen auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

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

2. Vorbereitung der Inokulate

Eine 48 bis 72 Stunden alte Kultur von angereichertem Thioglycollatmedium, Hackfleischmedium oder Kolonien einer CDC-anaeroben, 5%igen Schafblutagar-Platte, die in ein vorreduziertes Röhrcchen mit angereichertem Thioglycollatmedium gegeben wurden, verwenden und auf einen McFarland-Trübheitsstandard von 0,5 einstellen.

3. Die Röhrcchen mit einer für 0,01 mL kalibrierten Impföse mit dem standardisierten Inokulum für den betreffenden Organismus inokulieren.

4. Röhrcchen mit verschlossenen Verschlusskappen bei 35 ± 2 °C in einer aeroben Atmosphäre inkubieren.

5. Röhrcchen nach 18 bis 24 und nach 42 bis 48 Stunden auf Wachstum überprüfen.

6. Zu erwartende Ergebnisse

CLSI-Kontrollorganismen (ATCC-Stämme)

**Peptostreptococcus anaerobius*.....Wachstum
(27337)

**Bacteroides vulgatus*.....Wachstum
(8482)

**Clostridium perfringens*.....Wachstum
(13124)

Weitere verwendete Stämme

Porphyromonas leviiWachstum
(29147)

Clostridium novyi A.....Wachstum
ATCC 7659

* Empfohlener Stamm des Mikroorganismus für Qualitätssicherung durch den Anwender.

III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE

1. Röhrcchen wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben begutachten.

2. Röhrcchen stichprobenweise visuell auf Beschädigungen und Unregelmäßigkeiten überprüfen, um sicherzustellen, dass diese die spätere Nutzung nicht beeinträchtigen können.

3. pH-Wert mit dem Potentiometer bei Raumtemperatur darauf überprüfen, ob ein Bereich von 7,0 ± 0,2 eingehalten wird

4. Nicht inokulierte Röhrcchen stichprobenweise bei 20 – 25 °C und bei 30 – 35 °C inkubieren und nach 7 Tagen auf Kontamination durch Mikroorganismen überprüfen.

PRODUKTINFORMATIONEN

IV VERWENDUNGSZWECK

Thioglycollatmedium, angereichert mit Vitamin K₁ und Häm, ist ein Mehrzweckmedium, welches in qualitativen Verfahren zur Kultivierung von hochselektiven und nichtselektiven Mikroorganismen, einschließlich aerober und anaerober Bakterien, aus einer Vielzahl von klinischen und nichtklinischen Materialien verwendet wird.

V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das angereicherte Thioglycollatmedium ist **BBL Thioglycollate Medium** ohne Indikator 135C unter Zusatz von Vitamin K₁ und Häm.¹⁻³ Das angereicherte Bouillonmedium wird für die Isolierung und Kultivierung von hochselektiven oder langsam wachsenden, obligat anaeroben Mikroorganismen empfohlen, die in klinischen Materialien vorhanden sind.^{4,5} Es wird zudem empfohlen für die Isolierung und Kultivierung einer Vielzahl von aeroben und fakultativen Mikroorganismen. Das Medium wird mit einer anaeroben Überstands Atmosphäre zubereitet und gemäß den CDC-Empfehlungen in Röhrcchen mit Schraubverschluss geliefert.⁴ Es hat sich gezeigt, dass einige Anaerobier zum Wachsen Vitamin K₁ und Häm benötigen.^{6,7}

Für die Isolierung von Mikroorganismen aus klinischen Materialien sind häufig angereicherte Bouillonmedien zusätzlich zu den selektiven, differenzierten und nichtselektiven Agarmedien, die normalerweise für die primäre Isolierung verwendet werden, erforderlich. Durch die Verwendung flüssiger „Sicherungs“-Medien verringert sich die Wahrscheinlichkeit, einen ätiologischen, nur in geringer Zahl vorhandenen, auf Agarmedien nur langsam wachsenden Stoff, der empfindlich ist gegenüber ausgewählten Substanzen und in Bezug auf ungünstige Inkubationsbedingungen – wie beispielsweise unzureichende Anaerobiose für das optimale Wachstum obligater Anaerobier – komplett zu „verpassen“.

VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Natriumthioglykolat, ein Reduktionsmittel, wahrt eine niedrige Sauerstoffspannung im Medium. Vitamin K₁ wird von einigen *Prevotella melaninogenica*-Stämmen zum Wachsen benötigt⁶ und es gibt Berichte, denen zufolge es das Wachstum einiger Stämme der *Bacteroides*-Spezies und der grampositiven Nichtsporenbilder verstärkt.⁸ Häm in ist die Quelle des X-Faktors, der das Wachstum vieler Mikroorganismen stimuliert.

VII REAGENZIEN

Thioglycollate Medium, angereichert mit Vitamin K₁ und Hemin

Ungefähre Zusammensetzung* pro L destilliertem Wasser

| | | |
|--|-------|---|
| Pankreatisch abgebautes Casein | 17,0 | g |
| Papainisch abgebautes** Sojamehl | 3,0 | g |
| Dextrose | 6,0 | g |
| Natriumchlorid | 2,5 | g |
| Natriumthioglykolat | 0,5 | g |
| Agar | 0,7 | g |
| L-Cystin | 0,25 | g |
| Natriumsulfit | 0,1 | g |
| Häm in | 0,005 | g |
| Vitamin K ₁ | 0,001 | 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.

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

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“⁹⁻¹² sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Präparierte Röhren, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Aufbewahrung

Röhren nach Erhalt bei 2 – 8 °C im Dunkeln aufbewahren. Nicht einfrieren oder überhitzen. Erst unmittelbar vor Gebrauch öffnen. Vor Lichteinwirkung schützen. In Röhren gemäß Kennzeichnung aufbewahrte Nährbögen können bis zum Verfallsdatum inokuliert und über die empfohlene Zeit inkubiert werden. Das Medium vor der Inokulation auf Raumtemperatur erwärmen lassen.

Haltbarkeit des Produkts

Röhren 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 enthält die einschlägige Fachliteratur.^{13,14} Die Proben sollten vor der Gabe anderer Antibiotika entnommen werden. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

IX VERFAHREN

Mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Thioglycollate Medium, angereichert mit Vitamin K₁ und Hemin

Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial

Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

Testverfahren

Antiseptische Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Flüssigmedien für die anaerobe Inkubation sollten vor der Inokulation reduziert werden. Hierzu die Röhren mit gelösten Verschlusskappen vor Gebrauch 18 bis 24 Stunden lang einer anaeroben Umgebung aussetzen. Ein wirksamer und einfacher Weg, eine geeignete anaerobe Umgebung zu schaffen, ist die Verwendung des anaeroben Systems **BBL GasPak EZ**. Alternativ dazu können Flüssigmedien auch unmittelbar vor dem Gebrauch durch Kochen*

mit gelösten Verschlusskappen reduziert und anschließend vor der Inokulation auf Raumtemperatur heruntergekühlt werden. Die Proben gleich nach Eintreffen im Labor im gewünschten Medium inokulieren.

Bei Flüssigproben sollten die Medien in den Röhrchen mit einem oder zwei Probentropfen inokuliert werden.

Gewebepollen sollten zur Kultivierung von Mikroorganismen zerkleinert und in eine sterile, reduzierte Bouillon, wie Enriched Thioglycollate Medium, gemahlen werden. Die Inokulation wird dann wie für Flüssigproben durchgeführt.

Abstrichproben können nach der Inokulation der Agarmedien in die Bouillon gegeben werden. Alternativ kann der Abstrich auch in eine geringe Menge steriler, reduzierter Bouillon, wie beispielsweise in Enriched Thioglycollate Medium, „gerieben“ und die Bouillon dann zur Inokulation der Medien wie mit Flüssigproben verwendet werden.

Proben die bekanntlich oder vermutlich obligate Anaerobier enthalten, sollten in Bodennähe des Röhrchens inokuliert werden. Die Röhrchen mit geschlossenen Verschlusskappen aerob bei 35 ± 2 °C oder einer anderen geeigneten Temperatur inkubieren.

Die Bouillonkulturen sollten wenigstens 1 Woche aufbewahrt werden, bevor sie als negativ entsorgt werden.¹⁵

***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

Wachstum in Bouillonröhrchen wie Enriched Thioglycollate Medium zeigt sich im Vergleich mit einer nicht inokulierten Kontrolle durch das Vorhandensein von Trübheit.

Wenn Wachstum erfasst wird, sollten die Kulturen durch Gramfärbung untersucht und eine Subkultur auf selektiven und nichtselektiven Agarmedien angelegt werden. Wird das Vorhandensein von Anaerobiern vermutet, sollten ebenfalls Subkulturen auf entsprechend geeigneten anaeroben Agarmedien angelegt werden.

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.¹⁵

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.^{13,14,16}

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.

XII LEISTUNGSMERKMALE

Vor der Freigabe werden alle Chargen von Thioglycollate Medium, angereichert mit Vitamin K₁ und Hemin, auf ihre Leistungsmerkmale getestet. Vor der Inokulation werden Proben der Charge stichprobenweise durch mindestens 10-minütiges Kochen in einem Wasserbad reduziert und anschließend abgekühlt. Die Röhrchen werden mit einer für 0,01 mL kalibrierten Impfpöse mit Kulturen inokuliert, die auf einen McFarland-Trübungsstandard von 0,5 eingestellt wurden. Die Inokula für *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) und *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) werden aus Kolonien präpariert, die auf CDC-anaerobem 5%igen Schafsbloodagar kultiviert und in vorreduziertem und Thioglycollate Medium, Enriched auf die korrekte Inokulumkonzentration eingestellt wurden. Das Inokulum für *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) wird aus dem Thioglycollate Medium, Enriched, das Inokulum für *C. novyi* A (ATCC 7659) wird aus dem Chopped Meat Glucose Broth, PR II gewonnen. Die Röhrchen werden unter der Bouillonoberfläche so tief wie möglich in das Medium inokuliert. Die Verschlusskappen werden sofort nach der Inokulation verschlossen. Die Röhrchen werden aerob bei 35 ± 2 °C inkubiert. Die Röhrchen werden nach 18 bis 24 Stunden und nach 42 bis 48 Stunden bezüglich des Wachstums überprüft. Alle Organismen zeigen nach 48 Stunden Spuren von starkem Wachstum.

XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr. Beschreibung

| | |
|--------|--|
| 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 LITERATUR.

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. Attebery, 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 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