



**BBL Thioglycollate Medium,
Enriched with Vitamin K₁ and Hemin
L007509 • Wersja 14 • październik 2015**



PROCEDURY KONTROLI JAKOŚCI (Opcjonalnie)

I WPROWADZENIE

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin jest to podłoże o ogólnym przeznaczeniu do hodowli drobnoustrojów wymagających i niewymagających.

II PROCEDURA KONTROLI DZIAŁANIA

1. Zredukować próbówki z podłożem, gotując* je z poluzowanymi nakrętkami. Po gotowaniu natychmiast dokręcić nakrętki i pozostawić próbówki do ostygnięcia w temperaturze pokojowej.
***UWAGA:** Nie zaleca się korzystania z kuchenki mikrofalowej.
2. Przygotowanie materiału do wysiania
Stosować hodowle 48-godzinne do 72-godzinnych z podłoża Enriched Thioglycollate Medium, podłoża Chopped Meat Medium lub kolonie z płytki CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar, które zostały przeniesione do uprzednio zredukowanej próbówki zawierającej Enriched Thioglycollate Medium i dostosować stopień zmętnienia do standardu 0,5 McFarland.
3. Za pomocą sterylnej wykalibrowanej 0,01 mL ezy, nanieść do próbek próbki wystandaryzowanego materiału do wysiania dla każdego drobnoustroju.
4. Inkubować próbówki w temperaturze 35 ± 2°C w środowisku zawierającym tlen, z dokręconymi nakrętkami.
5. Ocenić wzrost w próbkach po upływie 18 do 24 godzin i 42 do 48 godzin.
6. Oczekiwanie wyników

Drobnoustroje kontrolne CLSI (szczepy ATCC)

**Peptostreptococcus anaerobius*..... Wzrost
(27337)

**Bacteroides vulgatus* Wzrost
(8482)

**Clostridium perfringens*..... Wzrost
(13124)

Dodatkowe szczepy stosowane

Porphyromonas levii Wzrost
(29147)

Clostridium novyi A..... Wzrost
ATCC 7659

*Szczep zalecany do przeprowadzania kontroli jakości przez użytkownika.

III DODATKOWA KONTROLA JAKOŚCI

1. Ocenić próbówki według opisu w dziale „Pogorszenie jakości produktu.”
2. Wzrokowo ocenić reprezentatywne próbówki, aby upewnić się, że żadne istniejące wady fizyczne nie będą przeszkadzały w ich użytkowaniu.
3. Za pomocą metody potencjometrycznej określić pH w temperaturze pokojowej, aby upewnić się, że odczyn jest zgodny ze specyfikacją i wynosi 7,0 ± 0,2.
4. Inkubować reprezentatywne próbówki bez wysianych drobnoustrojów w temperaturze 20 do 25°C i 30 do 35°C i ocenić po 7 dniach pod względem zanieczyszczenia drobnoustrojami.

INFORMACJE O PRODUKCIE

IV PRZEZNACZENIE

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin jest to podłoże o ogólnym przeznaczeniu stosowane w procedurach jakościowych do hodowli drobnoustrojów wymagających i niewymagających, między innymi bakterii tlenowych i beztlenowych, z różnego rodzaju materiału klinicznego i nieklinicznego.

V STRESZCZENIE I OBJAŚNIENIA

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin jest to **BBL** Thioglycollate Medium bez wskaźnika-135C z dodatkiem witaminy K₁ i heminy.¹⁻³ Wzbogacone podłoże bulionowe zalecane jest do stosowania do izolacji i hodowli drobnoustrojów wymagających lub wolno rosnących, obligatoryjnie beztlenowych, występujących w materiałach klinicznych.^{4,5} Zalecane jest również do izolacji i hodowli wielu drobnoustrojów tlenowych i fakultatywnie beztlenowych. Podłoże jest przygotowywane z wolną fazą beztlenową i jest dostarczane w zamykanych nakrętkami próbkach, zgodnie z zaleceniami CDC.⁴ Wykazano, że witamina K₁ i hemina są konieczne do wzrostu niektórych beztlenowców.^{6,7}

Izolacja drobnoustrojów z materiałów klinicznych często wymaga zastosowania wzbogaconych podłoży bulionowych obok selektywnych, różnicujących i nieselektywnych podłoży na płytkach, które zwykle stosowane są do początkowej izolacji. Zastosowanie płynnych podłoży „zapasowych” zmniejsza możliwość całkowitego pominięcia czynnika etiologicznego występującego w niewielkiej ilości, wolno rosnącego na podłożach stałych, wrażliwego na czynniki selektywne lub wrażliwego

na niekorzystne warunki inkubacji; tzn., niewystarczające warunki beztlenowe do optymalnego wzrostu obligatoryjnych beztlenowców.

VI ZASADA PROCEDURY

Tioglikolan sodu jest czynnikiem redukującym, utrzymuje niską prężność tlenu w pożywce. Witamina K₁ jest niezbędna dla wzrostu niektórych szczepów *Prevotella melaninogenica*⁶ i wykazano, że zwiększa wzrost niektórych szczepów *Bacteroides* oraz bakterii Gram-dodatnich, które nie wytwarzają przetrwalników.⁸ Hemina jest źródłem czynnika X, który stymuluje wzrost wielu mikroorganizmów.

VII ODCZYNNIKI

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Przybliżony skład* w przeliczeniu na jeden litr wody oczyszczonej

Trzustkowy hydrolizat kazeiny	17,0 g
Hydrolizat papainowy mączki sojowej	3,0 g
Dekstroza	6,0 g
Chlorek sodu	2,5 g
Tioglikolan sodu	0,5 g
Agar	0,7 g
L-cystyna	0,25 g
Siarczan sodu	0,1 g
Hemina	0,005 g
Witamina K ₁	0,001 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 patogenne, takie jak wirusy zapalenia wątroby i wirus HIV. Przy kontakcie z wszelkimi materiałami zanieczyszczonymi krwią lub innymi płynami ustrojowymi należy przestrzegać „Standardowych środków bezpieczeństwa”⁹⁻¹² oraz zaleceń obowiązujących w danej instytucji. Po użyciu wykorzystane próbki, pojemniki na próbki i inne skażone materiały należy przed wyrzuceniem wyjałowić w autoklawie.

Zalecenia dotyczące przechowywania:

Po otrzymaniu przechowywać próbki w ciemnym pomieszczeniu, w temperaturze 2 – 8°C. Unikać zamrażania i przegrzania. Nie otwierać do chwili użycia. Ograniczać kontakt ze światłem. W pożywkach przechowywanych do momentu użycia w próbkach, 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 próbek, 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 znaleźć można w odpowiednim piśmiennictwie.^{13,14} Probki należy pobierać przed podaniem czynnika przeciw drobnoustrojom. Należy jak najszybciej dostarczyć próbki do laboratorium.

IX PROCEDURA

Dostarczane materiały

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Materiały wymagane, ale niedostarczane

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

Procedura testowa

Stosować techniki aseptyczne.

Podłoża płynne do inkubacji beztlenowej należy zredukować przed inokulacją, poprzez umieszczenie próbek z poluzowanymi nakrętkami w warunkach beztlenowych na 18 do 24 przed użyciem. Skuteczną i łatwą metodą uzyskania warunków beztlenowych jest zastosowanie systemu beztlenowego **BBL GasPak EZ**. Alternatywnie, podłoża płynne można zredukować bezpośrednio przed użyciem poprzez gotowanie* z poluzowanymi nakrętkami i ostudzenie do temperatury pokojowej z nakrętkami dokręconymi.

Nanieść próbkę na wybrane podłoże natychmiast po jej uzyskaniu z laboratorium. W przypadku próbek płynnych, na podłoże w próbce należy nanieść jedną lub dwie krople próbki. Probki tkankowe w celu hodowli drobnoustrojów należy rozdrobnić, zmielić i zawiesić w jałowym, zredukowanym bulionie, takim jak Enriched Thioglycollate Medium. Następnie nanosi się próbkę tak samo, jak w przypadku próbek płynnych. Probki pobrane jako wymaz na tamponie można wprowadzić do bulionu po naniesieniu ich na podłoża na płytkach. Alternatywnie, tampon można „oczyścić” w małej objętości jałowego, zredukowanego

buliony, takiego jak wzbogacone podłoże tioglikolanowe, a następnie nanieść bulion do próbki, jak w przypadku próbek płynnych.

Próbki, o których wiadomo lub podejrzewa się, że zawierają beztlenowce obligatoryjne, należy nanosić w pobliżu dna próbki. Inkubować próbki z dokręconymi nakrętkami w warunkach tlenowych w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$ lub w innej odpowiedniej temperaturze.

Hodowle bulionowe należy trzymać przez co najmniej 1 tydzień przed wyrzuceniem ich jako ujemne.¹⁵

***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

Wzrost w próbkach bulionowych zawierających na przykład Enriched Thioglycollate Medium manifestuje się jako zmętnienie w porównaniu do niezakażonej kontroli.

W razie wykrycia wzrostu, hodowle należy ocenić za pomocą barwienia metodą Grama, a następnie przesiać na podłoża selektywne i nieselektywne na płytkach. Jeżeli podejrzewa się wzrost bakterii beztlenowych, należy również wykonać przesianie na odpowiednie beztlenowe podłoża na płytkach.

XI OGRANICZENIA PROCEDURY

Beztlenowce mogą zostać przerosnięte 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.¹⁵

Do identyfikacji niezbędne są czyste kultury drobnoustrojów. W celu ostatecznej identyfikacji należy przeprowadzić badania morfologiczne, biochemiczne i/lub serologiczne. Dodatkowe informacje oraz zalecane procedury znaleźć można w odpowiednich materiałach referencyjnych.^{13,14,16}

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

XII CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA

Przed wydaniem oceniana jest charakterystyka wydajnościowa wszystkich serii Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin. Przed inokulacją reprezentatywne próbki serii są redukowane poprzez gotowanie w łaźni wodnej przez co najmniej 10 minut i chłodzenie. Za pomocą wykalibrowanej ezy 0,01 mL wprowadza się do próbek hodowle dostosowane pod względem stopnia zmętnienia do standardu 0,5 McFarland. Materiały zawierające *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) i *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) przygotowywane są z kolonii rosnących na płytkach z podłożem CDC Anaerobe 5% Sheep Blood Agar i dostosowywane są do właściwego stężenia w uprzednio zredukowanym Thioglycollate Medium, Enriched. Materiał zawierający *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) pobiera się z Thioglycollate Medium, Enriched, a materiał zawierający *C. novyi* A (ATCC 7659) pobiera się z Chopped Meat Glucose Broth, PR II. Materiał wprowadza się do próbek poniżej powierzchni bulionu, tak głęboko, jak jest to możliwe. Natychmiast po wprowadzeniu próbki dokręca się nakrętki i inkubuje się próbki w warunkach tlenowych w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Wzrost w próbkach odczytuje się po upływie 18 do 24 godzin i 42 do 48 h. Wszystkie drobnoustroje wykazują po 48 godzinach wzrost od śladowego do silnego.

XIII DOSTĘPNOŚĆ

Numer kat. Opis

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 PIŚMIENICTWO

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.

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