



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



POSTUPY PRI KONTROLE KVALITY (Opcionalno)

I ÚVOD

Produkt Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K₁ a hemínom) predstavuje všeobecne použiteľnú pôdu určenú na kultiváciu náročných i nenáročných mikroorganizmov.

II REALIZÁCIA TESTU

1. Pôdu zredukujte zahriatím skúmavky* s pootvoreným uzáverom na bod varu. Po dosiahnutí bodu varu okamžite utiahnite uzáver a nechajte skúmavky vychladnúť na izbovú teplotu.
***POZNÁMKA.** Použitie mikrovlnnej rúry sa neodporúča.
2. Príprava očkovacej látky
Použite 48- až 72-hodinovú kultúru z obohatenej tioglykolátovej pôdy, pôdy s mletým mäsom alebo kolónií z anaeróbného krvného agaru CDC s 5 % ovčej krvi prenesených do skúmavky s vopred zredukovanou obohatenou tioglykolátovou pôdou, pričom upravte zákal na úroveň zodpovedajúcu hodnote 0,5 podľa McFarlandovej stupnice.
3. Pomocou sterilnej kalibračnej slučky s objemom 0,01 mL naočkujte skúmavky štandardizovanou očkovacou látkou pre každý organizmus.
4. Skúmavky inkubujte s utiahnutými uzávermi v aeróbnom prostredí pri teplote 35 ± 2 °C.
5. Po 18 až 24 a 42 až 48 hodinách skontrolujte rast mikroorganizmov v skúmavkách.
6. Očakávané výsledky

Testovacie organizmy CLSI (kmene ATCC)

**Peptostreptococcus anaerobius* rast
(27337)

**Bacteroides vulgatus* rast
(8482)

**Clostridium perfringens* rast
(13124)

Ďalšie využívané kmene

Porphyromonas levii rast
(29147)

Clostridium novyi A rast
ATCC 7659

*Kmeň odporúčaný na kontrolu kvality používateľom.

III DODATOČNÁ KONTROLA KVALITY

1. Skontrolujte skúmavky podľa popisu v časti Znehodnotenie produktu.
2. Vizualne skontrolujte niekoľko skúmaviek, aby ste zistili prípadné poškodenie, ktoré by bránilo ich použitiu.
3. Pri izbovej teplote stanovte pomocou potenciometra hodnotu pH, aby ste skontrolovali zachovanie hodnoty 7,0 ± 0,2.
4. Inkubujte niekoľko nenačkovaných skúmaviek pri teplote 20 až 25 °C a 30 až 35 °C. Po 7 dňoch skontrolujte mikrobiálnu kontamináciu.

INFORMÁCIE O PRODUKTE

IV POUŽITIE

Produkt Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K₁ a hemínom) je všeobecne použiteľná pôda určená pre kvalitatívne postupy pri kultivácii náročných i nenáročných mikroorganizmov, vrátane aeróbnych a anaeróbnych baktérií, z rôznych klinických i neklinických materiálov.

V ZHRNUTIE A VYSVETLENIE

Obohatená tioglykolátová pôda je tioglykolátová pôda radu **BBL** bez indikátora -135C obohatená vitamínom K₁ a hemínom.¹⁻³ Obohatený bujón je vhodný na využitie pri izolácii a kultivácii náročných alebo pomaly rastúcich organizmov, predovšetkým anaeróbnych, prítomných v klinických materiáloch.^{4,5} Súčasne je vhodný na izoláciu a kultiváciu širokej škály aeróbnych a fakultatívne anaeróbnych mikroorganizmov. Pri príprave pôdy sa v jej hornej časti necháva anaeróbný priestor. Pôda sa dodáva v skúmavkách so skrutkovacím uzáverom v súlade s odporúčaniami Centra pre kontrolu ochorení (CDC).⁴ Pri raste niektorých anaeróbnych baktérií bola preukázaná potreba vitamínu K₁ a hemínu.^{6,7}

Pri izolácii mikroorganizmov z klinických materiálov je často potrebné použiť okrem selektívnych, diferenčných a neselektívnych médií bežne využívaných pri primárnej izolácii aj obohatený bujón. Využitie tekutej „záložnej“ pôdy znižuje riziko úplného vylúčenia etiologického agensu prítomného v nízkych hodnotách, pomaly rastúceho na pôdach v Petriho

miskách, reagujúceho na selektívne činitele alebo citlivého na nepriaznivé podmienky inkubácie, t. j. anaerobiózu nedostatočnú pre optimálny rast viazaných anaeróbov.

VI PRINCÍPY POSTUPU

Thioglykolát sodný ako redukujúca látka udržiava v pôde nízku koncentráciu kyslíka. Vitamín K₁ je potrebný pre rast niektorých kmeňov rodu *Prevotella melaninogenica*.⁶ Súčasne bolo zistené, že zvyšuje rast niektorých kmeňov *Bacteroides* organizmov a gramopozitívnych organizmov, ktoré netvoría spóry.⁸ Hemín je zdrojom X. faktora, ktorý stimuluje rast viacerých mikroorganizmov.

VII ZLOŽENIE

Produkt Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (Tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K₁ a hemínom)

Približné zloženie* na liter purifikovanej vody

Pankreatický kazeínový hydrolyzát	17,0	g
Sójový hydrolyzát	3,0	g
Dextróza	6,0	g
Chlorid sodný	2,5	g
Tioglykolát sodný	0,5	g
Agar	0,7	g
L-cystín	0,25	g
Siričitan sodný	0,1	g
Hemín	0,005	g
Vitamín K ₁	0,001	g

*Upravené a/alebo doplnené podľa potreby, aby boli splnené analytické parametre.

Varovania a upozornenia

Len na diagnostické použitie *in vitro*.

Výsledky priameho Gramovho farbenia alebo výsledky iného priameho mikrobiologického farbenia vzoriek tkaniva spracovaných týmto médiom treba interpretovať uvažlivo vzhľadom na možnú prítomnosť organizmov, ktoré nie sú životaschopné, v kultivačnom médiu.

Uzavreté skúmavky otvárajte opatrne, aby ste ich nerozbili a nezranili sa úlomkami skla.

V klinických vzorkách sa môžu vyskytovať patogénne mikroorganizmy vrátane vírusov hepatitídy a vírusu HIV. Pri práci so všetkými materiálmi kontaminovanými krvou a inými telesnými tekutinami treba dodržiavať štandardné pracovné postupy⁹⁻¹² a smernice príslušných inštitúcií. Pred likvidáciou sterilizujte všetky použité skúmavky, nádoby so vzorkami a iný kontaminovaný materiál autoklávom.

Pokyny na uskladnenie

Dodané skúmavky skladujte na tmavom mieste pri teplote 2 až 8 °C. Nezmrazujte ani nevystavujte nadmernej teplote. Otvorte až pred použitím. Chráňte pred svetlom. Pôdy v skúmavkách skladovaných podľa pokynov a otvorených až tesne pred použitím je možné očkovať až do dátumu použiteľnosti a inkubovať počas odporúčaného času inkubácie. Pred inkubáciou pôdu nechajte zohriať na laboratórnu teplotu.

Znehodnotený výrobok

Skúmavky nepoužívajte, ak sú na nich viditeľné známky mikrobiálnej kontaminácie, zmeny farby, vysušenia alebo iné znaky poškodenia.

VIII ODBER VZORIEK A MANIPULÁCIA S NIMI

Vzorky vhodné na kultiváciu sa môžu odoberať rôznymi spôsobmi. Podrobné informácie nájdete v príslušných príručkách.^{13,14} Vzorky by sa mali odoberať ešte pred začiatkom podávania antibiotík. Je potrebné zabezpečiť rýchlu prepravu vzoriek do laboratória.

IX POSTUP

Dodávaný materiál

Produkt Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (Tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K₁ a hemínom)

Potrebný materiál, ktorý nie je súčasťou dodávky

Prídavné kultivačné médiá, činidlá, organizmy určené na kontrolu kvality a potrebné laboratórne vybavenie.

Postup testu

Dodržiavajte zásady aseptickej práce.

Tekuté pôdy určené na anaeróbnú inkubáciu je potrebné pred inkubáciou zredukovať umiestnením skúmaviek s uvoľnenými uzávermi na 18 až 24 hodín do anaeróbného prostredia. Vhodné anaeróbné prostredie efektívne a ľahko vytvoríte použitím anaeróbných vreciek **BBL GasPak EZ**. Kvapalné pôdy môžete zredukovať aj tesne pred použitím, ak skúmavky* s uvoľnenými uzávermi pred očkovaním ponoríte do kúpeľa s vriacou vodou a následne utesníte uzávery a skúmavky ochladíte na izbovú teplotu.

Vzorky naočkujte do vybranej pôdy ihneď po ich doručení do laboratória. V prípade tekutých vzoriek je potrebné naočkovať pôdu v skúmavke jednou alebo dvoma kvapkami vzorky. Na kultiváciu mikroorganizmov je potrebné rozomlieť a podrviť vzorky tkanív v sterilnom redukovanom bujóne, napríklad v obohatenej tioglykolátovej pôde. Pri očkovaní potom postupujte rovnako ako u tekutých vzoriek. Vzorky na tampónoch môžete po naočkovaní pôdy v miskách vložiť do bujónu. Tampóny môžete aj „vyprat“ v malom množstve sterilného redukovaného bujónu, napríklad v obohatenej tioglykolátovej pôde a bujónom naočkovať pôdu podobne ako pri tekutých vzorkách.

Vzorky s potvrdeným alebo predpokladaným obsahom viazaných anaeróbov by mali byť naočkované pri dne skúmavky. Skúmavky zo zatiahnutými uzávermi inkubujte v anaeróbnom prostredí pri teplote 35 ± 2 °C alebo pri inej vhodnej teplote.

Negatívne kultúry z bujónu by sa mali najmenej 1 týždeň uchovávať, až potom zlikvidovať.¹⁵

***POZNÁMKA.** Použitie mikrovlnnej rúry sa neodporúča.

Kontrola kvality používateľom

Informácie nájdete v časti Postupy pri kontrole kvality.

Svaka séria podloga ispitana je koristeći odgovarajuće organizme za kontrolu kvaliteta i ta ispitivanja zadovoljavaju specifikaciju proizvođača i CLSI standarde, gde je to bitno. Kao i uvek, ispitivanje kontrole kvaliteta treba da se obavi u skladu sa važećim lokalnim, državnim, saveznim ili nacionalnim propisima, zahtevima za akreditaciju i/ili standardnim postupcima kontrole kvaliteta vaše laboratorije.

Na potenciometrické stanovenie pH pôdy v skúmavkách sa použije jediná elektróda, ktorá musí byť dostatočne malá, aby vošla do skúmavky. Hrot elektródy sa musí umiestniť pod povrch bujónovej kultúry.

X VÝSLEDKY

Rast v skúmavkách s bujónom, napríklad s obohatenou tioglykolátovou pôdou, sa prejavuje zákalom viditeľným pri porovnaní s nenaočkovanou kontrolnou vzorkou.

Ak nastane rast, kultúry by mali byť otestované metódou Gramovho farbenia a naočkované do misiek so selektívnou a neselektívnou pôdou. Kultivované vzorky by mali byť naočkované na príslušné anaeróbne pôdy aj v prípade predpokladaného výskytu anaeróbných mikroorganizmov.

XI OBMEDZENIA POSTUPU

Rast anaeróbných mikroorganizmov môže byť prekrytý rýchlejšie rastúcimi fakultatívnymi organizmami. Ak na pôde v miske nenastane žiadny rast, bujón preskúšajte a použite metódu Gramovho farbenia. Pri izolácii anaeróbných organizmov sa nikdy nespoliehajte iba na kultúry z bujónu. Niektoré anaeróbne mikroorganizmy môžu byť potlačené produktmi metabolizmu alebo kyselinami produkovanými rýchlejšie rastúcimi fakultatívnymi mikroorganizmami.¹⁵

Na identifikáciu organizmov je potrebné využiť čistú kultúru. Konečná identifikácia si vyžaduje ďalšie morfológické, biochemické, prípadne sérologické testy. Podrobnejšie informácie a odporúčané postupy nájdete v príslušnej literatúre.^{13,14,16}

Kultivačné média niekedy obsahujú usmrtené organizmy pochádzajúce z ich zložiek, ktoré môžu byť viditeľné v náteroch týchto médií. Inými zdrojmi usmrtených organizmov viditeľných po farbení podľa Grama sú farbiace činidlá, imerzný olej, podložné sklíčka a vzorky používané na očkovanie. Ak sú pochybnosti o validite farbenia podľa Grama, kultúru je potrebné znovu inkubovať ďalšiu jednu až dve hodiny a zopakovať test pred konečným hodnotením.

XII VLASTNOSTI TESTU

Pred uvedením na trh sa testuje účinnosť každého balenia produktu Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K₁ a hemínom). Pred očkovaním sa reprezentatívne vzorky z jednotlivých súprav zredukujú privedením do bodu varu vo vodnom kúpeli minimálne na 10 minút a následným ochladením. Do skúmaviek sa pomocou kalibrovanej kľučky s objemom 0,01 mL naočkujú kultúry upravené tak, aby dosiahli mieru zákalu zodpovedajúcu hodnote 0,5 McFarlandovej stupnice. Očkovacie látky pre mikroorganizmy *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) a *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) sa pripravujú z kolónií kultivovaných na anaeróbnom agare CDC s 5 % ovčej krvi a upravujú na správnu minimálnu koncentráciu očkovacej látky vo vopred redukovanej obohatenej tioglykolátovej pôde. Očkovacia látka pre mikroorganizmy *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) sa získava z obohatenej tioglykolátovej pôdy a očkovacia látka pre mikroorganizmy *C. novyi* A (ATCC 7659) sa získava z pôdy Chopped Meat Glucose Broth, PR II. Skúmavky sa očkujú čo najhlbšie pod povrchom bujónu. Okamžite po očkovaní sa skúmavky uzavrú a inkubujú v aeróbnom prostredí pri teplote 35 ± 2 °C. Úroveň rastu v skúmavkách sa odčíta po 18 až 24 hod. a 42 až 48 hod. U všetkých organizmov je viditeľný rozsiahly rast po 48 hod.

XIII DOSTUPNOSŤ

Kat. č.	Popis
221742	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin (tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K ₁ a hemínom), 5 mL
221787	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin (tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K ₁ a hemínom), 8 mL
221788	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin (tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K ₁ a hemínom), 8 mL
297292	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin (tioglykolátová pôda obohatená vitamínom K ₁ a hemínom), 10 mL

XIV POUŽITÁ LITERATÚRA

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.

Technický servis BD Diagnostics: obráťte sa na miestneho zástupcu spoločnosti BD alebo 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