

KOKYBĖS KONTROLĖS PROCEDŪROS

I. ĮVADAS

Trypticase Soy Agar (sojos agaras) – tai bendros paskirties terpė, palaikanti reiklų ir nereiklų mikroorganizmų augimą.

II. VEIKIMO TYRIMO PROCEDŪRA

- Suskystinkite terpę giliose mėgintuvėliuose kaitindami verdančiame vandenyje. Ataušinkite iki 45 – 50 °C, įpilkite 1 mL sterilaus avies kraujo be fibrino į du mėgintuvėlius (sėjimui su *Streptococcus* kamienais) ir supilkite į sterilias Petri lėkšteles. Gerai išmaišykite, kad kraujas pasiskirstytų terpėje, ir leiskite kietėti ne mažiau kaip 30 minučių.
- Sėkite tipinius mėginius su toliau išvardytomis kultūromis.
 - Naudodami 0,01 mL kalibruotą kilpelę užsėkite agaro paviršius naudodami 10⁻¹ atskiestą 18 – 24 h **Trypticase** Soy Broth (sojos buljono) kultūras. Ruoželiais užsėkite plokšteles ir taip užtikrinsite, kad kolonijos būtų gerai atskirtos.
 - Inkubuokite plokšteles arba nuožulnius mėgintuvėlius (su atsuktais dangteliais) 35 ± 2 °C temperatūroje aerobinėje atmosferoje. Kraujo plokšteles reikia inkubuoti esant anglies dioksido.
- Ištirkite plokšteles ar mėgintuvėlius po 18 – 24 ir 42 – 48 h ir nustatykite augimo ir pigmentacijos kiekį. Ištirkite kraujo agaro plokšteles, norėdami nustatyti hemolizę.
- Laukiami rezultatai

Organizmai	ATCC	Atgavimas
Terpė nepridėjus kraujo.		
* <i>Shigella flexneri</i>	12022	Augimas. Vidutinės–didelės kolonijos, pilkai baltos, permatomos, šiek tiek gaubtos, gali būti gleivingos.
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Augimas
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Augimas. Vidutinės–didelės kolonijos, matinės, apskritos, visos, turinčios nuo kreminės ir geltonos iki auksinio atspalvio spalvos pigmento.
Terpė pridėjus sterilaus avies kraujo be fibrino (gilūs mėgintuvėliai).		
* <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Augimas. Kolonijos, apsuptos alfa hemolizės zonų (žalios).
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Augimas. Kolonijos, apsuptos beta hemolizės zonų (nuo skaidrių iki drumstų).

*Rekomenduojama organizmų atmaina naudotojo atliekamai kokybės kontrolei.

III. PAPILDOMA KOKYBĖS KONTROLĖ

- Ištirkite mėgintuvėlius, kaip aprašyta skyriuje „Produkto blogėjimas“.
- Apžiūrėkite tipinius mėgintuvėlius ir įsitikinkite, kad naudoti netrukdo jokie esami fiziniai defektai.
- pH nustatykite potenciometru kambario temperatūroje, laikykitės 7,3 ± 0,2 specifikacijos.
- Inkubuokite neužsėtus tipinius mėgintuvėlius 20 – 25 °C ir 30 – 35 °C temperatūroje ir po 7 dienų ištirkite ieškodami užteršimo mikrobais.

INFORMACIJA APIE PRODUKTĄ

IV. NAUDOJIMO PASKIRTIS

Trypticase sojos agaras naudojamas siekiant izoliuoti ir kultivuoti reiklius ir nereiklius mikroorganizmus, įskaitant anaerobines ir aerobines bakterijas, nors tai nėra tinkamiausia terpė anaerobams.

V. SANTRAUKA IR PAAIŠKINIMAS

Dėl savo maistinės sudėties **Trypticase** sojos agaras jau daug metų yra populiari terpė. Tai terpė, kuri kaip sojos pupelių-kazeino hidrolizato agaro terpė nurodyta *United States Pharmacopeia* (Jungtinių Valstijų farmakopėjoje) visai aerobinei mikrobų skaičiaus daliai, atliekant mikrobų ribinio tyrimo procedūras.¹

Ši terpė naudojama įvairiais tikslais, įskaitant standartinių kultūrų priežiūrą, plokštelių skaičiavimą, mikroorganizmų atskyrimą iš įvairių tipų mėginių ir naudojama kaip terpės su krauju pagrindas.²⁻⁴ Ji įtraukta į vandens, nuotekų ir maisto produktų tyrimo metodų kompendiumus.^{5,6}

VI. PROCEDŪROS PRINCIPAI

Trypticase sojos agare esantis kazeino ir sojos peptonų derinys teikia azotą turinčių organinių junginių, ypač amino rūgščių ir ilgesnių grandinių peptidų, ir padaro terpę labai maistingą. Natrio chloridas palaiko osmosinę pusiausvyrą.

VII. REAGENTAI

Trypticase Soy Agar

Apytikrė sudėtis* litre išgryninto vandens

Kasos fermentais hidrolizuotas kazeinas15,0 g

Papainu hidrolizuoti sojos pupelių miltai5,0 g

Natrio chloridas5,0 g

Agaras15,0 g

*Pakoreguota ir (arba) papildyta pagal poreikį, kad atitiktų veikimo kriterijus.

Įspėjimai ir atsargumo priemonės: Skirta naudoti *in vitro* diagnostikai.

Mėgintuvėlius su hermetiškais dangteliais reikia atidaryti atsargiai, kad nesusižeistumėte, jei stiklas bus skilęs.

Klinikiniuose mėginiuose gali būti patogeninių mikroorganizmų, įskaitant hepatito virusus ir žmogaus imunodeficitą virusą. Dirbant su bet kuriomis priemonėmis, kurios užterštos krauju ir kitais organizmo skysčiais, reikia imtis įprastų atsargumo priemonių⁷⁻¹⁰ ir laikytis įstaigos vidaus taisyklių. Panaudotus paruoštus mėgintuvėlius, mėginių kontenerius ir kitas užterštas medžiagas prieš išmetant reikia sterilizuoti autoklave.

Laikymo nurodymai: gavę mėgintuvėlius, laikykite juos tamsoje, 2 – 25 °C temperatūroje. Venkite užšaldymo ir perkaitinimo. Neatidarykite, kol nebūsate pasiruošę naudoti. Ilgai nelaikykite šviesoje. Etiketėmis pažymėtą terpę mėgintuvėliuose iki pat pirmojo naudojimo galima užsėti iki galiojimo pabaigos datos ir inkubuoti rekomenduojamą inkubavimo laiką. Prieš sėdami palaukite, kol terpė sušils iki kambario temperatūros.

Produkto kokybės pablogėjimas: nenaudokite užterštų mikroorganizmais, pakitusios spalvos, išdžiūvusių ar kitokių blogos kokybės mėgintuvėlių.

VIII. MĖGINIO PAĖMIMAS IR APDOROJIMAS

Kultūroms tinkamus mėginius galima apdoroti įvairiomis technikomis. Jei pageidaujate išsamesnės informacijos, perskaitykite atitinkamus tekstus.^{3,11} Mėginius reikia paimti prieš skiriant antimikrobinių priemonių. Reikia pasiruošti, kad medžiagą būtų galima greitai nusiųsti į laboratoriją.

IX. PROCEDŪRA

Tiekiamos medžiagos: Trypticase Soy Agar

Būtinės, bet netiekiamos medžiagos: papildoma kultūros terpė, reagentai, kokybės kontrolės organizmai ir kitos reikalingos laboratorinės priemonės.

Tyrimo procedūra: laikykite sterilumo reikalavimų.

Suskystinkite terpę giliuose mėgintuvėliuose kaitindami verdančiame vandenyje. Atvėsinkite iki 45 – 50 °C, įpilkite kraujo, jei reikia, ir supilkite į sterilius Petri lėkšteles.

Jei naudojimo paskirtis bendra, laboratorijoje gautą mėginį kuo greičiau pasėkite ruoželiais. Ruoželiais užsėta lėkštelė visų pirma naudojama grynomis kultūroms iš mišrią florą turinčių mėginių išskirti. O jei medžiaga

sėjama tiesiogiai nuo tampono, paritinėkite jį mažame paviršiaus plotelyje prie krašto, o tada ruoželiais užsėkite iš šio plotelio. Kadangi daugeliui pirmą kartą išskiriamų patogenų reikalingas anglies dvideginis, plokšteles reikia inkubuoti atmosferoje, kurioje yra apie 3 – 10 % CO₂. Plokšteles inkubuokite 35 ± 2 °C temperatūroje 18 – 24 h.

Nuožulnūs **Trypticase** sojos agarų mėgintuvėliai pirmiausia naudojami grynomis kultūroms auginti ir prižiūrėti. Juos reikia užsėti sėjimo kilpele ir inkubuoti tokiomis pačiomis sąlygomis, kaip terpes plokštelėse.

Naudotojo atliekama kokybės kontrolė: žr. „Kokybės kontrolės procedūros“.

Kokybės kontrolės reikalavimai privalo atitikti galiojančias vietines, valstybines ir (arba) federalines taisykles arba akreditavimo reikalavimus, taip pat jūsų laboratorijos standartines kokybės kontrolės procedūras. Rekomenduojama, kad darbuotojas remtųsi atitinkamomis CLSI (anksčiau NCCLS) instrukcijomis ir CLIA taisyklėmis, skirtomis tinkamai kokybės kontrolės praktikai.

X. REZULTATAI

Po inkubacijos daugumoje plokštelių bus matomas susiliejančių kolonijų augimo plotas. Kadangi sėjimas ruoželiais iš esmės yra „skiedimo“ būdas, srityse, kuriose daromi ruoželiai, lieka vis mažiau mikroorganizmų. Todėl vienoje ar daugiau šių sričių turėtų būti matomos pavienės mėginio mikroorganizmų kolonijos. Be to, remiantis kiekvienoje brūkšnių sričių matomu kolonijų augimu, galima pusiau kiekybiškai įvertinti kiekvieno mikroorganizmo augimą.

Hemolizinės reakcijos turi būti stebimos, jei organizmai užsėjami terpėje su krauju.

Nuožulnius mėgintuvėlius su grynomis kultūromis galima naudoti papildomiems tyrimams arba kaip standartines kultūras, jei reikia.

XI. PROCEDŪROS APRIBOJIMAI

Siekiant identifikuoti, organizmai turi būti grynoje kultūroje. Norint identifikuoti galutinai, reikia atlikti morfologinius, biocheminius ir (ar) serologinius tyrimus. Daugiau informacijos ir rekomenduojamas procedūras žr. atitinkamuose tekstuose.^{3,11,12}

XII. VEIKIMO CHARAKTERISTIKOS

Trypticase sojos agaras (TSA) su 5 % avies kraujo buvo naudotas kaip kontrolė tyrime, kur buvo naudota buljone sustiprinta kultūra (Todd Hewitt) ir optinis imunotyrinimo metodas, siekiant diagnozuoti β-hemolizinę streptokokų infekciją. Ištirti penki šimtai du (502) mėginiai. TSA su 5 % avies kraujo būdingas jautrumas ir specifiskumas, lygūs 92,5% ir 99,4 % atitinkamai.¹³ Nguyen et al. naudojo **Trypticase** sojos agarą su 5 % avies krauju kaip „auksinį standartą“ aptinkant B grupės *Streptococcus* iš nėščių moterų apatinio lytinių takų.¹⁴ Kitame tyrime Rossmann et al. sėkmingai pakartotinai išskyrė *Lautropia mirabilis* **Trypticase** sojos agare su 5 % avies kraujo iš žmogaus imunodeficito virusu užkėstų vaikų.¹⁵ Iš 85 tirtų vaikų 35 (41,4 %) nustatyta *L. mirabilis*. Isenberg et al. naudojo **Trypticase** sojos agarą su 5 % avies kraujo kaip kontrolę vertindami *Enterococcus* atgavimą iš pasirinktos tiriamos terpės.¹⁶ Buvo naudota du šimtai penkiasdešimt (250) D grupės streptokoko atmainų, išskirtų iš klinikinės medžiagos, ir 8 atmainos, gautos iš Nacionalinio užkrečiamųjų ligų centro (Atlanta, GA.). Kantor et al. išlaikė standartines kultūras kambario temperatūroje, naudodami **Trypticase** sojos agarų nuožulnius mėgintuvėlius, uždengtus sterilia mineraline alyva, tyrimui, kuris buvo atliekamas klinikinėje laboratorijoje, siekiant nustatyti nefermentuojančias gramneigiamas bakterijas.¹⁷

XIII. GALIMA ĮSIGYTI

Kat. Nr.	Aprašymas
221082	BD BBL Trypticase Soy Agar Deep's (sojos agarų gilūs mėgintuvėliai) (pylimo mėgintuvėliai), 20 mL, 10 A dydžio mėgintuvėlių pakuotėje
221086	BD BBL Trypticase Soy Agar Slants (sojos agarų nuožulnūs mėgintuvėliai), 10 K dydžio mėgintuvėlių pakuotėje
221087	BD BBL Trypticase Soy Agar Slants (sojos agarų nuožulnūs mėgintuvėliai), 100 K dydžio mėgintuvėlių dėžutėje

XIV. LITERATŪRA

1. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. 2006. The U.S. pharmacopeia 29/The national formulary 24-2006. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md.
2. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
3. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
4. Chapin, K.C., and P.R. Murray. 1999. Media, p. 1687-1707. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Clesceri, L.S., A.E. Greenberg, and A.D. Eaton (ed.) 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
6. Downes, F.P. and K. Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
8. 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.
9. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
10. 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.
11. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Tenover, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.) 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. 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.
13. Fries, S.M. 1995. Diagnosis of group A streptococcal pharyngitis in a private clinic: comparative evaluation of an optical immunoassay method and culture. J. Ped. vol. 126, number 6.
14. Nguyen, T.M. et al. 1998. Detection of group B streptococcus: comparison of an optical immunoassay with direct plating and broth-enhanced culture methods. J. Matern. Fetal. Med. Jul-Aug; 7(4):172-176.
15. Rossmann, S.N. et al. 1998. Isolation of *Lautropia mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus infected children. J. Clin. Microbiol. 36:1756-1760.
16. Isenberg, H.D., D. Goldberg, and J. Sampson. 1970. Laboratory studies with a selective medium. Appl. Microbiol. Sept. 1970, p.433-436.
17. Kantor, L.T., D.K. Spyros, and R.B. Yee. 1975. Identification of nonfermentative gram-negative bacteria in the clinical laboratory. Amer. J. Med. Tech. vol. 41, no. 1.

Techninis aptarnavimas ir palaikymas iš „BD Diagnostics“: kreipkitės į vietinį BD atstovą arba 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, BBL, GasPak and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2014 BD.