

PROCEDURER FÖR KVALITETSKONTROLL (Valfritt)

I INLEDNING

Flytande tioglykollatmedium är ett universalmedium som används för odling av anaeroba, mikroaerofila och aeroba organismer och rekommenderas som ett medium för sterilitetstestning av biologiska prover.

II PRESTANDATESTFÖRFARANDE

1. Inokulera representativa prover med de odlingar som anges nedan.

a. Före användning ska locken lossas och rören placeras i kokande vatten* i cirka 5 min, tills mediet har reducerats (färglöst). Dra åt locken omedelbart efter att ha tagit bort rören från värmen. Låt mediet svalna till rumstemperatur.

***OBS!** Användning av mikrovågsugn rekommenderas ej.

b. Bered en spädning innehållande högst 100 CFU/mL från 24- till 48-h-odlingar i **Trypticase** sojabuljong eller berikat tioglykollatmedium av *Bacteroides*- och *Clostridium*-stammar.

c. Inokulera rören med 0,75 mL av spädningarna med hjälp av sterila 1,0 mL-pipetter.

d. Inkubera rören med lossade lock vid 30 – 35 °C i en aerob atmosfär, med undantag av CLSI-stammarna (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 och *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), vilka ska inokuleras med åtdragna lock.

2. Undersök rören med de CLSI-rekommenderade kontrollstammarna (åtdragna lock) med avseende på växt vid 18 – 24 och 48 h. Undersök rören med de övriga (USP-rekommenderade) kontrollstammarna med avseende på växt i upp till tre 3 dagar.

3. Förväntade resultat

CLSI-organismer	ATCC	Utbyte
* <i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Växt
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Växt
Ytterligare organismer		
(USP tillväxtfrämjande test)		
** <i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Växt
** <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Växt
** <i>Clostridium sporogenes</i>	11437	Växt
** <i>Clostridium sporogenes</i>	19404	Växt
** <i>Bacillus subtilis</i>	6633	Växt
** <i>Kocuria rhizophila</i>	9341	Växt
** <i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	Växt

* Rekommenderad organismstam för kvalitetskontroll utförd av användaren.

**För verifiering av tillväxtfrämjande för användning i USP sterilitetstest.

III YTTERLIGARE KVALITETSKONTROLL

1. Undersök rören enligt beskrivningen i avsnittet "Produktförsäkring".

2. Undersök representativa rör visuellt för att försäkra dig om att inga existerande fysiska defekter kommer att inverka på användningen.

3. Fastställ pH potentiometriskt vid rumstemperatur så att värdet på 7,1 ± 0,2 enligt specifikationen följs.

4. Inkubera oinokulerade representativa rör vid 20 – 25 °C och 30 – 35 °C och undersök dem efter 7 dagar med avseende på mikrobiell kontamination.

PRODUKTINFORMATION

IV AVSEDD ANVÄNDNING

Flytande tioglykollatmedium överensstämmer med specifikationerna i *United States Pharmacopeia (USP)*.

Flytande tioglykollatmedium (FTM) används för sterilitetstestning av biologiskt material och för odling av anaeroba, aeroba och mikroaerofila organismer.

V SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

Flytande tioglykollatmedium togs fram av Brewer för snabbodling av anaeroba och aeroba.¹ Den gjordes först tillgänglig i dehydrerad form av Baltimore Biological Laboratory (BBL) 1940. Inkorporeringen av kaseinpepton infördes av Vera 1944.²

Detta medium kan stödja god växt av en mängd kräsna organismer, både patogena och icke patogena arter. En av egenskaperna hos natriumtioglykollat, utöver dess förmåga att sänka oxidations-/reduktionspotentialen, är dess förmåga att neutralisera den antibakteriella aktiviteten hos kvicksilverföreningar. Dessa egenskaper gör FTM särskilt användbart för att bestämma närvaro av kontamination i biologiska och andra material. BBL-sammansättningen uppfyller kraven för USP tillväxtfrämjande test.³

Flytande tioglykollatmedium kan användas efter beredning till dess cirka 30 % av mediet har oxiderats, vilket indikeras av resazurinets rosa färg på ytan. Om oxidationen har gått längre kan buljongen värmas upp en gång till i ånga eller kokande vatten, svalna av och användas.

VI PRINCIPER FÖR FÖRFARANDE

Dextros, pepton, L-cystin och jästextrakt tillhandahåller de tillväxtfaktorer som är nödvändiga för bakteriell replikation. Natriumklorid tillhandahåller essentiella joner. Natriumtioglykollat är ett reducerande medel som förhindrar ackumulation av peroxider, vilka är dödliga för vissa mikroorganismer. Även L-cystin är ett reducerande medel, eftersom det innehåller sulfhydrylgrupper, vilka inaktiverar tungmetallföreningar och upprätthåller en låg redoxpotential och därigenom stödjer anaerobios. Resazurin är en oxidations-/reduktionsindikator som är rosa när den är oxiderad och färglös när den är reducerad. Den lilla mängden agar hjälper till att upprätthålla en låg redoxpotential genom att stabilisera mediet mot konvektionsströmmar och därigenom upprätthålla anaerobios i mediets djupare skikt.⁴ USP listar 5,5 g/L dextros i formuleringen för flytande tioglykollatmedium. BBL-formuleringen innehåller den vattenfria formen av dextros (5,0 g/L).

VII REAGENSER

Fluid Thioglycollate Medium

Ungefärlig sammansättning* per liter renat vatten

Hydrolys. kasein framst. m. pankreasenz.	15,0 g	Natriumklorid.....	2,5 g
L-cystin	0,5 g	Natriumtioglykolat	0,5 g
Dextros (vattenfritt)	5,0 g	Resazurin	0,001 g
Jästextrakt	5,0 g	Agar	0,75 g

*Justerad och/eller kompletterad efter behov för att uppfylla prestandakriterierna.

Varningar och försiktighetsbeaktanden: Avsett för *in vitro*-diagnostik.

Försiktighet bör iakttagas vid rapportering av resultat av direkt Gramfärgning och/eller annan direkt mikrobiologisk färgning på vävnadsprover som behandlats med detta medium, på grund av den eventuella närvaron av icke-viärliga organismer i odlingsmediet.

Rör med lock som sitter åt hårt ska öppnas försiktigt så att inte skador inträffar på grund av att glaset går sönder.

Patogena mikroorganismer, inklusive hepatitvirus och humant immunbristvirus, kan förekomma i kliniska prover. "Allmänna försiktighetsbeaktanden"⁵⁻⁸ och institutionens riktlinjer bör följas vid hantering av alla föremål som kontaminerats med blod eller andra kroppsvätskor. Efter användning skall alla preparerade rör, provbehållare och övrigt kontaminerat material steriliseras i autoklav innan de kasseras.

Förvaringsanvisningar: Förvara rören mörkt efter mottagandet, i enlighet med anvisningarna på etiketten. Överhettning och nedfrysning skall undvikas. Får ej öppnas förrän omedelbart före användning. Undvik exponering för ljus. Medier i rör som förvarats enligt anvisningarna till precis före användning kan inokuleras fram till utgångsdatum och inkuberas under de rekommenderade inkubationstiderna. Låt mediet värmas till rumstemperatur före inokulering.

Produktnedbrytning: Rören får inte användas om de visar tecken på mikrobiell kontamination, missfärgning, uttorkning eller annan försämrning.

VIII PROVTAGNING OCH -FÖRBEREDELSE

Prover som är lämpliga för odling kan hanteras med olika metoder. För detaljerad information hänvisas till lämplig litteratur.^{9,10} Prover skall tas före administrering av antimikrobiella medel. Åtgärder måste vidtas för snabb leverans till laboratoriet.

IX FÖRFARANDE

Tillhandahållt material: Fluid Thioglycollate Medium (Flytande tioglykolatmedium)

Material som krävs men ej medföljer: Extra odlingsmedier, reagenser, organismer för kvalitetskontroll och laboratorieutrustning efter behov.

Testförfarande: Använd aseptisk teknik.

Före användning ska locken lossas och rören placeras i kokande vatten* i cirka 5 min, tills mediet har reducerats (färglöst). Dra åt locken omedelbart efter att ha tagit bort rören från värmen. Låt mediet svalna till rumstemperatur.

För allmän användning ska proverna inokuleras direkt i mediet och rören inkuberas i upp till 7 dagar vid 35 ± 2 °C.

För sterilitetstestning ska rekommendationer i USP³ och från olika kontrollorgan följas.¹¹ Dessa referenskällor specificerar den kvot mellan medium och produkt som ska användas i sterilitetstester, liksom detaljer rörande provuttagning och tolkning av testresultat. Vid sterilitetstestning är det viktigt att mediet i testkärlet reduceras i tillräckligt hög grad för att säkerställa replikation av obligata anaeroba och mikroaerofila organismer. Om provet gör mediet så grumligt att mikrobiell växt inte påvisas ska provet överföras till ett färskt medium.

*OBS! Användning av mikrovågsugn rekommenderas ej.

Kvalitetskontroll utförd av användaren: Se "Procedurer för kvalitetskontroll".

Varje sats av media har testats med lämpliga kvalitetskontrollorganismer, och denna testning uppfyller produktspecifikationerna och CLSI-standarderna, där detta är relevant. Som alltid måste kvalitetskontroll utföras i enlighet med gällande lokala, statliga, regionala eller nationella bestämmelser eller ackrediteringskrav och/eller laboratoriets fastställda rutiner för kvalitetskontroll.

En enda elektrod som är liten nog för att passa i rören skall användas för att potentiometriskt bestämma pH i medier i rör. Elektrodspetsen ska placeras under buljongmediets yta.

X RESULTAT

Efter inkubering påvisas tillväxt genom grumlighet, jämfört med en ej inokulerad kontroll. Strikta aeroba tenderar att växa i ett tunt lager vid buljongens yta, medan obligata anaeroba endast växer i den del av buljongen som finns under det oxiderade (rosa) lagret. Genom att noggrant avlägsna vätska från olika nivåer är det möjligt att separera olika arter i en blandad kultur.

XI PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

Anaeroba kan bli överväxta av mer snabbväxande fakultativa organismer. Undersök och Gramfärga buljongen om plattmedium inte påvisar växt. Förlita dig aldrig uteslutande på buljongkulturer för isolering av anaeroba. Vissa anaeroba kan inhiberas av metabola produkter eller syror producerade av mer snabbväxande fakultativa anaeroba.¹²

Odlingsmedier innehåller ibland döda organismer framtagna från ingredienser i mediet, vilka kan vara synliga i utstryk från odlingsmedier. Andra källor för döda organismer som är synliga vid Gramfärgning inkluderar färgreagenser, immersionsoljor, objektglas eller inokulerade prover. Om Gramfärgningens validitet är osäker skall odlingen återinkuberas i en eller två timmar och testet upprepas innan rapporten lämnas.

För identifiering måste organismer vara i renkultur. Morfologiska, biokemiska och/eller serologiska tester bör utföras för fullständig identifiering. Se lämplig litteratur för noggrann information och rekommenderade förfaranden.^{9,10,13}

XII KLINISKA PRESTANDA

Innan de släpps testas prestandan på alla partier flytande tioglykolatmedium. Före inokulering reduceras representativa prover från samma parti genom att kokas i vattenbad i cirka 5 min. Efter avsvälning inokuleras rören med 0,75 mL av kulturer med *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 och 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) och *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 och ATCC 25923). Inokulatet för *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* och *S. aureus* späds för att innehålla högst 100 kolonibildande enheter (CFU) per mL. *B. vulgatus*-inokulatet bereds från kolonier som odlats på CDC anaerobagarplattor med 5 % färbod och justerats i tioglykolatmedium utan dextros och indikator för att erhålla 10 – 100 CFU/mL. På rör innehållande *B. fragilis* och *S. aureus* skruvas locken åt omedelbart efter inokulering. På övriga rör lossas locken. Rören inkuberas vid 35 ± 2 °C. Rör

innehållande *B. fragilis* och *S. aureus* (ATCC 25923) visar spår av växt till kraftig växt inom 48 h inkubering. Övriga organismer visar måttlig till kraftig växt inom 3 dagar efter påbörjad inkubering.

XIII TILLGÄNGLIGHET

Kat. Nr.	Beskrivning
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, förpackning med 10 rör i storlek K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, kartong med 100 rör i storlek K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, kartong med 100 rör i storlek K (bläckstråleetikett)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, förpackning med 10 rör i storlek A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, kartong med 100 rör i storlek A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, kartong med 100 rör i storlek A (bläckstråleetikett)

XIV REFERENSER

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.

BD Diagnostics teknisk service: Kontakta närmaste BD-representant eller besök 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