

**MASSNAHMEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE****I EINFÜHRUNG**

Thioglykollat-Medium 135C ohne Indikator ist ein Mehrzweckmedium zur Kultivierung von Mikroorganismen, besonders von obligaten Anaerobiern.

**II LEISTUNGSPRÜFUNG**

1. Repräsentative Proben mit den nachstehend aufgeführten Kulturen inokulieren.
  - a) Verschlusskappen lösen und die Röhrchen 2 bis 5 Minuten lang in kochendes\* Wasser geben. Die Kappen unmittelbar nach dem Entnehmen aus der Hitze wieder anziehen und das Medium vor Gebrauch auf Raumtemperatur abkühlen lassen.  
**\*HINWEIS:** Die Verwendung von Mikrowellengeräten wird nicht empfohlen.
  - b) Mit sterilen 1,0-mL-Pipetten die Röhrchen mit Thioglykollat-Medium mit 1,0 mL einer Verdünnung aus 18 bis 24 h alten Bouillon-Kulturen inokulieren. Hackfleisch-Kohlenhydrat-Bouillon für *Bacteroides fragilis* und **Trypticase**-Soja-Bouillon für *Staphylococcus aureus* verwenden. Die für *S. aureus* verwendete Verdünnung sollte max. 1000 KBE/mL enthalten; die Verdünnung für *B. fragilis* sollte  $10^5$  –  $10^6$  KBE/mL enthalten.
  - c) Röhrchen mit geschlossenen Verschlusskappen bei  $35 \pm 2$  °C in einer aeroben Atmosphäre inkubieren.
2. Röhrchen nach 18 bis 24 und nach 48 h auf Wachstum überprüfen.
3. Zu erwartende Ergebnisse

<b>Mikroorganismen</b>	<b>ATCC</b>	<b>Isolierung</b>
* <i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Wachstum
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Wachstum

\* Empfohlener Stamm des Mikroorganismus für Qualitätssicherung durch den Anwender.

**III ZUSÄTZLICHE QUALITÄTSKONTROLLE**

1. Röhrchen wie unter „Haltbarkeit des Produkts“ beschrieben begutachten.
2. Röhrchen stichprobenweise visuell auf Beschädigungen und Unregelmäßigkeiten überprüfen, um sicherzustellen, dass diese die spätere Nutzung nicht beeinträchtigen können.
3. Den pH-Wert mit dem Potentiometer bei Raumtemperatur darauf überprüfen, ob ein Bereich von  $7,0 \pm 0,2$  eingehalten wird.
4. Nicht inokulierte Röhrchen stichprobenweise bei  $20 - 25$  °C und bei  $30 - 35$  °C inkubieren und nach 7 Tagen auf Kontamination durch Mikroorganismen überprüfen.

**PRODUKTINFORMATIONEN****IV VERWENDUNGSZWECK**

Thioglykollat-Medium 135C ohne Indikator ist ein angereichertes Mehrzweckmedium zur Gewinnung einer Vielzahl von Mikroorganismen, besonders von obligaten Anaerobiern, aus klinischen Proben und anderen Materialien.

**V ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG**

Thioglykollat-Medium wurde ursprünglich von Brewer<sup>1</sup> als ein Medium beschrieben, welches das Wachstum obligater anaerober sowie aerober Organismen begünstigt. Das ursprüngliche Thioglykollat-Medium wurde so modifiziert, dass es die Nährwertqualität von **Trypticase**-Soja-Bouillon erreichte. Daraus resultiert, dass die verbesserten Formel, 135C, ein breiteres Wachstumsspektrum sowohl pathogener als auch nichtpathogener, hochselektiver Mikroorganismen aufweist.<sup>2</sup> Die ursprüngliche Formel enthält darüber hinaus Methyleneblau; jedoch wird heutzutage kein Indikator für das Redoxpotential mehr verwendet. Dies vermeidet eine mögliche Toxizität des Indikators und vereinfacht einen frühen Wachstumsnachweis.

Thioglykollat-Medium 135C zeichnet sich durch seine herausragende Fähigkeit zur Wachstumsförderung von minimalen Inokula bis hin zu einer Vielzahl aerober und anaerober Organismen aus. Die am strengsten aeroben Spezies wachsen oben, wohingegen anaerobe Typen tiefer im Medium wachsen.

Thioglykollat-Medium 135C wird deshalb für die Verwendung als Mehrzweckmedium empfohlen, sowie für die Untersuchung von Blutkulturen und anderer Materialien, in denen eine Vielzahl aerober, fakultativer oder anaerober Organismen vorkommen kann.

Durch den Zusatz von Casein und Soja-Peptonen wird das Wachstum bestimmter aerober Organismen möglich, wie beispielsweise für Mitglieder des Genus *Brucella*, die nicht leicht auf flüssigem Thioglykollat-Medium wachsen. Beide Medien fördern das Wachstum streng anaerober Spezies, wie beispielsweise *Clostridium novyi*, *C. acetobutylicum*, *Actinomyces bovis* und *Bacteroides*, sowie fakultativer Pneumokokken, Streptokokken und anderer Bakterien.

Die Bouillon kann mit 10 % zugesetztem Serum zur Kultivierung von *Trichomonas vaginalis*, der Reiter-Spirochäten und anderer Organismen verwendet werden.

Aus diesem Grund wird das Medium gern als Anreicherungskultur für verschiedene Probenarten und darüber hinaus als Transportmedium verwendet. Wenn es für derartige Zwecke verwendet wird, wird die Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  empfohlen, da ansonsten hochselektive Organismen wachsen und dann schnell absterben können. Das  $\text{CaCO}_3$  dient zur Neutralisierung der während des Wachstums entstehenden Säuren. Schnelles Wachstum und Tod kann bei Fehlen von  $\text{CaCO}_3$  auftreten, z. B. bei Pneumokokken-Kulturen, gramnegativen Kokken, *C. perfringens* und anderen säureempfindlichen Bakterien.

## VI VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Das Casein und die Peptone des Sojabohnenmehls, Dextrose und Cystin liefern stickstoffhaltige und kohlenstoffhaltige Stoffe, fermentierbare Kohlenhydrate und Spurenelemente. Natriumchlorid liefert essenzielle Ionen. Schwefel wird von Natriumsulfid bereitgestellt. Natriumthioglykolat, ein Reduktionsstoff, senkt das Redoxpotenzial und ermöglicht somit obligaten anaeroben Organismen, tief im Medium zu wachsen. Die relativ geringe Agarmenge hilft bei der Prävention von Konvektionsströmen im Medium und trägt somit zum Erhalt der Anaerobiose bei.<sup>3</sup>

## VII REAGENZIEN

### Thioglycollate Medium without Indicator-135C

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

\*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.

Röhrchen 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“<sup>4-7</sup> sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Präparierte Röhrchen, Probenbehälter und sonstige kontaminierte Materialien nach Verwendung im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

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

**Haltbarkeit des Produkts:** Röhrchen 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. Nähere Informationen sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen.<sup>3,8</sup> Die Probenentnahme sollte vor der Verabreichung von Antibiotika erfolgen. Für einen umgehenden Transport zum Labor ist zu sorgen.

## IX VERFAHREN

**Mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Thioglycollate Medium without Indicator-135C

**Benötigtes, jedoch nicht mitgeliefertes Arbeitsmaterial:** Zusätzliche Kulturmedien, Reagenzien, Qualitätskontrollorganismen und Laborgeräte nach Bedarf.

**Testverfahren:** Antiseptische Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Flüssiges Medium für eine anaerobe Inkubation ist vor der Inokulation zu reduzieren; dazu die Röhrchen vor Gebrauch 18 bis 24 h mit gelockerten Kappen anaeroben Bedingungen 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.

Probe möglichst bald nach Eingang im Labor in das Medium inokulieren. Bei Flüssigproben sollten die Medien in den Röhrchen mit einem oder zwei Probentropfen inokuliert werden. Gewebeproben sollten zur Kultivierung von Mikroorganismen zerkleinert und in eine sterile, reduzierte Bouillon gemahlen werden. Die Inokulation wird dann wie bei Flüssigproben durchgeführt. Abstrichproben können nach der Inokulation der Plattenmedien in die Bouillon gegeben werden. Alternativ kann der Abstrich auch in eine geringe Menge steriler, reduzierter Bouillon „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 verschlossenen Kappen aerob bei 35 ± 2 °C oder einer anderen geeigneten Temperatur – je nach zu kultivierendem Organismustyp – inkubieren und 7 Tage lang täglich kontrollieren, bevor sie als negativ entsorgt werden, wenn nicht besondere Umstände vorliegen, die eine längere Inkubationszeit erfordern.<sup>3,9</sup>

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

**Qualitätssicherung durch den Anwender:** Siehe „Qualitätskontrollverfahren“.

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten CLSI-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

Eine Einzelelektrode, deren Durchmesser klein genug für die Röhrrchen ist, sollte verwendet werden, um den pH-Wert von Medien in Röhrrchen potentiometrisch zu ermitteln. Die Elektrodenspitze sollte unter der Oberfläche von Bouillonmedien platziert werden.

#### X ERGEBNISSE

Das Wachstum in den Bouillonröhrrchen wird durch den Trübungsgrad im Vergleich zu einer nicht inokulierten Kontrolle angezeigt. Es sollten Subkulturen der entsprechenden Festmedien angelegt werden, um Reinkulturen der Isolate zu erhalten, die dann weiter getestet und identifiziert werden können.

#### XI VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Anaerobier können von schneller wachsenden fakultativen Organismen überwuchert werden. Die Bouillon untersuchen und gramfärben, wenn das Plattenmedium 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.<sup>9</sup>

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.<sup>3,8,9</sup>

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 Thioglykolat-Medium 135C ohne Indikator auf ihre Leistungsmerkmale getestet. Vor der Inokulation werden repräsentative Proben der Charge durch 2 bis 5-minütiges Kochen im Wasserbad reduziert. Nach dem Abkühlen werden die Röhrrchen mit Kulturen von *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Clostridium novyi* (ATCC 7659) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) inokuliert. Das Inokulum (1 mL) für *S. aureus* wird aus einer Bouillonkultur gewonnen, die so weit angepasst wird, bis sie max. 1000 koloniebildende Einheiten (KBE) pro mL enthält. Das Inokulum (1 mL) für *B. fragilis* wird aus einer Bouillonkultur gewonnen, die so weit angepasst wird, bis sie max.  $10^5 - 10^6$  KBE pro mL enthält. Das Inokulum (0,01-mL-Öse) für *C. novyi* wird aus einer nicht verdünnten Bouillonkultur gewonnen; das Inokulum wird auf den Boden des Röhrrchens platziert. Die Verschlusskappen werden sofort nach der Inokulation verschlossen. Die Röhrrchen werden bei  $35 \pm 2$  °C inkubiert. Die Röhrrchen werden nach 18 bis 24 h und nach 42 bis 48 h auf Wachstum überprüft. Alle Organismen zeigen nach 48 Stunden Spuren von starkem Wachstum.

#### XIII LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr.	Beschreibung
221199	<b>BD BBL</b> Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, Packung mit 10 Röhrrchen der Größe K
221200	<b>BD BBL</b> Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, Karton mit 100 Röhrrchen der Größe K C C
221047	<b>BD BBL</b> Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 20 mL, Karton mit 100 Röhrrchen der Größe A

#### 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. Forbes, B.A., D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung oder [www.bd.com/ds](http://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