



PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE (Opcional)

I INTRODUÇÃO

O Fluid Thioglycollate Medium é um meio de utilização geral para cultura de anaeróbios, microaerófilos e aeróbios, e é recomendado como um dos meios de teste da esterilidade de materiais biológicos.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

1. Inocule as amostras representativas com as culturas listadas abaixo.
 - a. Antes de utilizar, desaperte as tampas e coloque os tubos em água a ferver* durante aproximadamente 5 min, até o meio ser reduzido (incolor). Aperte as tampas imediatamente depois de os retirar da fonte de calor. Deixe o meio arrefecer à temperatura ambiente.
***NOTA:** Não se recomenda a utilização do forno de microondas.
 - b. Para as estirpes de *Bacteroides* e *Clostridium* prepare, a partir de culturas em **Trypticase Soy Broth** ou culturas em Meio de tioglicolato enriquecido com 24 a 48 h, uma diluição contendo 100 ou menos UFC/mL.
 - c. Utilizando pipetas de 1,0 mL estéreis, inocule os tubos com 0,75 mL das diluições.
 - d. Incube os tubos com as tampas desapertadas, entre 30 e 35°C, numa atmosfera aeróbia, excepto para as estirpes do CLSI (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) que deverão ser incubadas com as tampas bem apertadas.
2. Examine os tubos das estirpes de controlo recomendadas pelo CLSI (tampas bem apertadas) entre as 18 e as 24 h e às 48 h, verificando se existe crescimento. Examine os tubos das outras estirpes de controlo (recomendadas pela USP), verificando se ocorreu crescimento, até um período máximo de 3 dias.
3. Resultados esperados

Microrganismos de controlo do CLSI (Estirpes ATCC)

**Bacteroides fragilis* Crescimento
(25285)

**Staphylococcus aureus* Crescimento
(25923)

Estirpes adicionais utilizadas

(Teste promotor do crescimento da USP)

***Staphylococcus aureus* Crescimento
ATCC 6538

***Pseudomonas aeruginosa* Crescimento
ATCC 9027

***Clostridium sporogenes* Crescimento
ATCC 11437

***Clostridium sporogenes* Crescimento
ATCC 19404

***Bacillus subtilis* Crescimento
ATCC 6633

***Kocuria rhizophila* Crescimento
ATCC 9341

***Bacteroides vulgatus* Crescimento
ATCC 8482

* Estirpe do microrganismo recomendada para o controlo de qualidade do utilizador.

** Para verificação da promoção do crescimento, para utilização com os Testes de esterilidade da USP.

III CONTROLO DE QUALIDADE ADICIONAL

1. Examine os tubos, conforme descrito na secção "Deterioração do produto".
2. Examine visualmente os tubos representativos, para assegurar que eventuais defeitos físicos não irão interferir com a utilização.

3. Determine o pH, através de potenciometria, à temperatura ambiente, para cumprimento da especificação de pH de $7,1 \pm 0,2$.
4. Incube os tubos representativos não inoculados entre 20 a 25°C e 30 a 35°C, e examine-os após 7 dias, verificando se existe contaminação microbiana.

INFORMAÇÕES SOBRE O PRODUTO

IV UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O Fluid Thioglycollate Medium (Meio líquido de tioglicolato) está em conformidade com as especificações da *The United States Pharmacopeia (USP)*.

O Fluid Thioglycollate Medium (FTM) é utilizado para testes da esterilidade de materiais biológicos e para cultura de bactérias anaeróbias, aeróbias e microaerófilas.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

O Fluid Thioglycollate Medium foi concebido por Brewer para cultura rápida de anaeróbios, bem como de aeróbios.¹ Foi disponibilizado primeiro na forma desidratada pelo *Baltimore Biological Laboratory (BBL)* em 1940. A incorporação de peptona da caseína foi efectuada por Vera em 1944.²

Este meio é capaz de sustentar o crescimento de uma grande variedade de microrganismos exigentes, pertencentes a espécies patogénicas e não patogénicas. Uma característica do tioglicolato de sódio, além do seu potencial de oxidação-redução, é a capacidade para neutralizar a actividade anti-bacteriana dos compostos de mercúrio. Estas características tornam o meio FTM particularmente útil para determinação da presença de contaminação em materiais biológicos e noutros materiais. A fórmula **BBL** cumpre os requisitos do teste promotor do crescimento da *USP*.³

Após a sua preparação, o Fluid Thioglycollate Medium pode ser utilizado até aproximadamente 30% do meio ter sido oxidado, conforme indicado pela cor rosa da resazurina à superfície. Se a oxidação progredir além deste valor, o meio líquido pode voltar a ser aquecido uma vez, através de vapor ou em água a ferver, depois arrefecido e utilizado.

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

A dextrose, a peptona, a L-cistina e o extracto de leveduras proporcionam os factores de crescimento necessários para a replicação bacteriana. O cloreto de sódio fornece iões essenciais. O tioglicolato de sódio é um agente redutor que impede a acumulação de peróxidos, que são letais para alguns microrganismos. A L-cistina também é um agente redutor, uma vez que contém grupos sulfidril que inactivam os compostos de metais pesados e mantêm um potencial de oxidação-redução baixo, suportando assim a anaerobiose. A resazurina é um indicador de oxidação-redução que fica cor-de-rosa quando é oxidado e transparente quando é reduzido. A pequena quantidade de ágar ajuda a manter um potencial de oxidação-redução baixo através da estabilização do meio contra correntes de convecção, mantendo por isso a anaerobiose nas zonas mais profundas do meio.⁴ A *USP* lista 5,5 g/L de dextrose na formulação de Fluid Thioglycollate Medium. A fórmula **BBL** contém a forma anídrica da dextrose (5,0 g/L).

VII REAGENTES

Fluid Thioglycollate Medium

Fórmula* aproximada por litro de água purificada	
Digerido pancreático de caseína.....	15,0 g
L-cistina	0,5 g
Dextrose (anídrica)	5,0 g
Extracto de leveduras	5,0 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Tioglicolato de sódio	0,5 g
Resazurina.....	0,001 g
Ágar.....	0,75 g

*Ajustada e/ou suplementada conforme necessário para cumprir os critérios do desempenho.

Advertências e Precauções

Para diagnóstico *in vitro*.

Deverá ser usado extremo cuidado ao fazer o relatório dos resultados de uma coloração Gram directa e/ou outra coloração microbiológica directa em amostras de tecidos processados com este meio, devido à possível presença de organismos não viáveis no meio de cultura.

Os tubos com tampas apertadas devem ser abertos com cuidado, para evitar lesões devido a quebra do vidro.

Nas amostras podem existir microorganismos patogénicos, incluindo os vírus das hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. No manuseamento de todos os itens contaminados com sangue e outros fluidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções padrão"⁵⁻⁸ e as linhas de orientação da instituição. Após a utilização e antes de serem eliminados, esterilize em autoclave os tubos preparados, recipientes de amostras e outros materiais contaminados.

Instruções de armazenamento

Após a recepção, armazenar as placas no escuro de acordo com as instruções do rótulo. Evitar congelar e aquecer excessivamente. Abra apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. Os meios que se encontram dentro de tubos que sejam armazenados conforme indicado no rótulo, até pouco antes de serem utilizados, podem ser inoculados até ao fim do prazo de validade e incubados durante o período de incubação recomendado. Antes da inoculação, deixar o meio aquecer até à temperatura ambiente.

Deterioração do produto

Não utilizar tubos que apresentem sinais de contaminação microbiana, descoloração, secagem ou outros sinais de deterioração.

VIII COLHEITA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

As amostras adequadas para cultura podem ser preparadas utilizando várias técnicas. Para obter informações pormenorizadas, consulte os textos apropriados.^{9,10} As amostras devem ser obtidas antes de serem administrados agentes antimicrobianos. Devem tomar-se as providências necessárias para a entrega imediata no laboratório.

IX PROCEDIMENTO

Material fornecido

Fluid Thioglycollate Medium

Material necessário mas não fornecido

Meios de cultura auxiliares, reagentes, microrganismos de controlo da qualidade e equipamento laboratorial, conforme necessário.

Procedimento do teste

Utilize técnicas assépticas.

Antes de utilizar, desaperte as tampas e coloque os tubos em água a ferver* durante aproximadamente 5 min, até o meio ser reduzido (incolor). Aperte as tampas imediatamente depois de os retirar da fonte de calor. Deixe o meio arrefecer à temperatura ambiente.

Para uma utilização geral, inocule as amostras directamente no meio e incube os tubos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante um período máximo de 7 dias.

Para os testes de esterilidade, devem ser cumpridas as recomendações da USP³ e de várias agências de controlo.¹¹ Estas fontes de referência especificam a razão meio/produto que deve ser utilizada nos testes de esterilidade, bem como os pormenores sobre a colheita de amostras e interpretação dos resultados dos testes. Para os testes de esterilidade, é importante que o meio nos recipientes de teste seja reduzido até um grau suficiente para garantir a replicação dos microrganismos anaeróbios obrigatórios e microaerófilos. Caso a amostra de teste torne o meio tão turvo que não seja fácil reconhecer o crescimento microbiano, deve ser efectuada uma transferência para novos meios.

***NOTA:** Não se recomenda a utilização do forno de microondas.

Controlo de qualidade pelo utilizador

Consulte "Procedimentos do controlo de qualidade".

Cada lote de meio foi testado com microrganismos de controlo de qualidade adequados e estes testes cumprem as especificações do produto e as normas CLSI, quando aplicáveis. Como é norma, os testes de CQ devem ser realizados de acordo com os regulamentos locais, distritais, federais ou nacionais, os requisitos de acreditação e/ou os procedimentos padrão de controlo de qualidade do laboratório.

Deverá ser utilizado um único eléctrodo de tamanho suficientemente pequeno que caiba nos tubos para determinar o pH, através de potenciometria, dos meios em tubo. A ponta do eléctrodo deverá ser colocada abaixo da superfície do meio líquido.

X RESULTADOS

Após a incubação, o crescimento nos tubos é evidenciado pela presença de turvação comparada com um controlo não inoculado. Os aeróbios estritos tendem a crescer em camada fina na superfície do meio líquido; os anaeróbios obrigatórios crescerão apenas na parte do meio líquido por baixo da camada superior oxidada (cor-de-rosa). Ao retirar com cuidado líquido de diferentes níveis, é possível aumentar a capacidade para separar diferentes espécies numa cultura mista.

XI LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os anaeróbios poderão ser ocultados por microrganismos facultativos com crescimento mais rápido. Examine e efectue a coloração Gram do meio líquido, caso o meio em placa não revele crescimento. Nunca confie apenas nas culturas em meio líquido para o isolamento de anaeróbios. Alguns anaeróbios podem ser inibidos pelos produtos metabólicos ou pelos ácidos produzidos por bactérias anaeróbias facultativas com crescimento mais rápido.¹²

Os meios de cultura muitas vezes contêm microrganismos mortos derivados de constituintes do meio, que poderão ser visíveis em esfregaços dos meios de cultura. Outras fontes de microrganismos mortos visíveis após a coloração Gram incluem os reagentes de coloração, o óleo de imersão, as lâminas de vidro e as amostras utilizadas para inoculação. Se houver dúvidas sobre a validade da coloração Gram, a cultura deverá ser novamente incubada durante uma a duas horas e o teste deverá ser repetido antes de ser apresentado um relatório.

Para a identificação, os microrganismos devem ser uma cultura pura. Para uma identificação final, devem ser efectuados testes morfológicos, bioquímicos e/ou serológicos. Para obter informações pormenorizadas e sobre os procedimentos recomendados, consulte os textos apropriados.^{9,10,13}

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Antes de serem comercializados, todos os lotes de Fluid Thioglycollate Medium são testados relativamente às características do desempenho. Antes da inoculação, as amostras representativas do lote são reduzidas fervendo-as em banho-maria aproximadamente durante 5 min. Após o arrefecimento, os tubos são inoculados com 0,75 mL de culturas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 e ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 e ATCC 25923). Os inóculos para *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* são diluídos de forma a conterem 100 ou menos unidades formadoras de colónias (UFC) por mL. O inóculo para *B. vulgatus* é preparado a partir de colónias que tenham crescido em placas CDC de Ágar de sangue ovino a 5% para anaeróbios e ajustado em Meio de tioglicolato sem dextrose e indicador, para obter 10 – 100 UFC/mL. As tampas devem ser apertadas imediatamente após a inoculação dos tubos contendo *B. fragilis* e *S. aureus*; as tampas dos restantes tubos devem ficar desapertadas. Os tubos são incubados a 35 ± 2°C. Os tubos contendo *B. fragilis* e *S. aureus* (ATCC 25923) apresentam crescimento ligeiro a intenso num período de incubação de 48 h. Os restantes microrganismos exibem crescimento moderado a intenso num período de 3 dias de incubação.

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat.	Descrição
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, emb. com 10 tubos K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, caixa com 100 tubos K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, caixa com 100 tubos K (rótulo a jacto de tinta)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, emb. com 10 tubos A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, caixa com 100 tubos A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, caixa com 100 tubos A (rótulo a jacto de tinta)

XIV BIBLIOGRAFIA

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.

Assistência Técnica e Suporte da BD Diagnostics: contacte o representante local da BD ou visite 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