



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

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD (Opcionales)

I INTRODUCCION

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin (medio de tioglicolato, enriquecido con vitamina K₁ y hemina) es un medio de propósito general para el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Reducir los tubos del medio hirviéndolos* con las tapas flojas. Después de hervir, ajustar las tapas de inmediato y permitir que los tubos se enfríen a temperatura ambiente.

***NOTA:** No se recomienda utilizar un horno de microondas.

2. Preparación de inóculos

Utilizar un cultivo de 48 – 72 h de Enriched Thioglycollate Medium, medio de carne picada o colonias de una placa de agar de sangre de carnero al 5% anaerobio CDC transferidas a un tubo previamente reducido de medio de tioglicolato enriquecido y ajustar a una turbidez comparable al patrón 0,5 de McFarland.

3. Con un asa calibrada estéril de 0,01 mL, inocular los tubos con el inóculo estandarizado para cada organismo.

4. Incubar los tubos con las tapas ajustadas a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia.

5. Examinar si los tubos después de 18 – 24 h y 42 – 48 h presentan indicios de crecimiento.

6. Resultados previstos

Organismos de control CLSI (cepas ATCC)

**Peptostreptococcus anaerobius*.....Crecimiento
(27337)

**Bacteroides vulgatus*.....Crecimiento
(8482)

**Clostridium perfringens*.....Crecimiento
(13124)

Cepas adicionales utilizadas

Porphyromonas levii.....Crecimiento
(29147)

Clostridium novyi A.....Crecimiento
ATCC 7659

*Cepa de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar los tubos como se describe en la sección "Deterioro del producto".

2. Examinar visualmente los tubos representativos para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.

3. Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de 7,0 ± 0,2.

4. Incubar tubos representativos sin inocular a una temperatura de 20 – 25 °C y 30 – 35 °C y examinar después de 7 días en busca de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin es un medio de uso general utilizado en procedimientos cualitativos para el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes, incluidas las bacterias aerobias y anaerobias, a partir de una variedad de muestras clínicas y no clínicas.

V RESUMEN Y EXPLICACION

Enriched Thioglycollate Medium es **BBL Thioglycollate Medium**, sin indicador 135C, suplementado con vitamina K₁ y hemina¹⁻³. El medio de caldo enriquecido está recomendado para el aislamiento y cultivo de microorganismos exigentes o de crecimiento lento anaerobios obligados presentes en muestras clínicas^{4,5}. También se recomienda para el aislamiento y cultivo de una amplia variedad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos. El medio se prepara con un espacio libre anaerobio de frasco y se proporciona en tubos con tapa roscada según las recomendaciones de CDC⁴. Se ha demostrado que la vitamina K₁ y la hemina son elementos requeridos por determinados organismos anaerobios para lograr crecimiento^{6,7}.

El aislamiento de microorganismos a partir de muestras clínicas con frecuencia requiere el uso de medios de caldo enriquecido, además de los medios en placa selectivos, de diferenciación y no selectivos normalmente utilizados para aislamiento primario. El uso de medios de "respaldo" líquido reduce la posibilidad de la falta completa de un agente etiológico presente en pequeñas cantidades, de crecimiento lento en medios en placa, sensible a agentes selectivos o

sensible a condiciones de incubación desfavorables; es decir, anaerobiosis insuficiente para un crecimiento óptimo de anaerobios obligados.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El tioglicolato sódico, un agente reductor, mantiene una baja tensión de oxígeno en el medio. La vitamina K₁ es un requisito para el crecimiento de algunas cepas de *Prevotella melaninogenica*⁶ y se ha descrito que favorece el crecimiento de algunas cepas de la especie *Bacteroides* y organismos gram positivos no formadores de esporas⁸. La hemina es la fuente de factor X que estimula el crecimiento de varios microorganismos.

VII REACTIVOS

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	17,0	g
Digerido papaico de harina de soja	3,0	g
Dextrosa	6,0	g
Cloruro sódico	2,5	g
Tioglicolato sódico	0,5	g
Agar	0,7	g
L-cistina	0,25	g
Sulfito sódico	0,1	g
Hemina	0,005	g
Vitamina K ₁	0,001	g

* Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Se debe tener cuidado al informar de los resultados de la tinción de Gram directa o de otros métodos directos de tinción microbiológica en muestras tisulares procesadas con este medio, debido a la posible presencia de microorganismos no viables en el medio de cultivo.

Los tubos con tapas ajustadas deben abrirse con cuidado para evitar lesiones por la rotura del vidrio.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar"⁹⁻¹² y las directrices del centro. Después de su utilización, los tubos preparados, los recipientes de muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Instrucciones para el almacenamiento

Al recibir los tubos, almacenarlos en un lugar oscuro a 2 – 8 °C. No congelar ni sobrecalentar. No abrir hasta que vayan a utilizarse. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Los medios en tubos almacenados como se indica en sus etiquetas hasta momentos antes de su utilización pueden ser inoculados hasta la fecha de caducidad e incubados durante los períodos recomendados de incubación. Dejar que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto

No utilizar los tubos si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras adecuadas para cultivo pueden manipularse mediante diversas técnicas. Para obtener información detallada, consultar los textos correspondientes^{13,14}. Las muestras deben obtenerse antes de administrar los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin

Materiales necesarios pero no suministrados

Medios de cultivo auxiliar, reactivos, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio que se requiera.

Procedimiento de análisis

Emplear técnicas asépticas.

Los medios líquidos para incubación anaerobia deben reducirse antes de la inoculación, colocando los tubos con las tapas flojas en atmósfera anaerobia durante 18 – 24 h antes de su utilización. Una manera eficaz y fácil de obtener condiciones anaerobias adecuadas es mediante el uso del sistema anaerobio **BBL GasPak EZ**. Los medios líquidos también se pueden reducir justo antes de utilizarlos, hirviéndolos* durante 10 min con las tapas de los tubos flojas y dejando enfriar, con las tapas ajustadas, a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Inocular la muestra en los medios de preferencia tan pronto como se reciba en el laboratorio. Con las muestras líquidas, los medios en tubos deben inocularse con una o dos gotas de la muestra. Las muestras tisulares deben triturarse y pulverizarse en un caldo reducido estéril, tal como el Enriched Thioglycollate Medium para el cultivo de microorganismos. Luego, la inoculación se realiza como con las muestras líquidas. Las muestras de torundas pueden

insertarse en el caldo después de inocular los medios en placa. También, la torunda puede “fregarse” en un pequeño volumen de caldo reducido estéril y éste utilizarse para inocular los medios de la manera en que se hace con las muestras líquidas.

Las muestras en las que se conocen o se sospechan organismos anaerobios obligados deben inocularse cerca de la base del tubo. Incubar los tubos con las tapas ajustadas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C y otra temperatura apropiada.

Los cultivos de caldo deben mantenerse durante al menos una semana antes de ser descartados como negativos¹⁵.

***NOTA:** No se recomienda utilizar un horno de microondas.

Control de calidad del usuario

Véase “Procedimientos de control de calidad”.

Cada lote de medios se ha probado con los microorganismos de control de calidad adecuados mediante una prueba que cumple las especificaciones del producto y los criterios aplicables del CLSI. Como siempre, las pruebas de control de calidad se deben llevar a cabo conforme a la normativa local, estatal, federal o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y/o a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio.

Se debería utilizar un electrodo suficientemente pequeño como para entrar en los tubos para determinar el pH potenciométricamente de los medios en tubos. La punta del electrodo se debe introducir en los caldos de cultivo.

X RESULTADOS

El crecimiento en tubos de caldo, tal como el medio enriquecido de tioglicolato, se demuestra por la aparición de turbidez cuando se los compara con un control sin inocular.

Si se detecta crecimiento, los cultivos deben examinarse mediante tinción de Gram y subcultivarse en medios en placa selectivos y no selectivos. Si se sospecha la presencia de anaerobios, también se deben realizar subcultivos en medios en placa anaerobios apropiados.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los organismos facultativos de crecimiento rápido pueden crecer más rápido que los anaerobios. Examinar y someter a tinción de Gram el caldo si el medio en placa no muestra crecimiento. Nunca confiar exclusivamente en cultivos de caldo para el aislamiento de anaerobios. Algunos anaerobios pueden ser inhibidos por productos metabólicos o ácido generados por anaerobios facultativos de crecimiento rápido¹⁵.

Para su identificación, los organismos deben encontrarse en un cultivo puro. Deben llevarse a cabo pruebas morfológicas, bioquímicas y/o serológicas para lograr una identificación final. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados^{13,14,16}.

Los medios de cultivo a veces contienen organismos muertos que se derivan de los componentes del medio, posiblemente visibles en frotis de medios de cultivo. Otras fuentes de organismos muertos visibles mediante tinción de Gram incluyen los reactivos de tinción, aceite de inmersión, portaobjetos de vidrio y muestras utilizadas para inoculación. Si no se tiene certeza de la validez de la tinción de Gram, el cultivo debe volverse a incubar durante 1 – 2 horas más y repetirse la prueba antes de emitir un informe.

XII CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Antes del lanzamiento del producto al mercado, todos los lotes de Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K₁ and Hemin se analizan para determinar sus características de rendimiento. Antes de la inoculación, se reducen muestras representativas del lote hirviéndolas en baño María durante al menos 10 minutos y se dejan enfriar. Con un asa calibrada de 0,01 mL, se inoculan tubos con cultivos ajustados a un patrón de turbidez 0,5 de McFarland. Se preparan inóculos para *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) y *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) a partir de colonias cultivadas en placas de agar de sangre de carnero al 5% anaerobio CDC y se ajustan a la concentración correcta de inóculo en medio enriquecido de tioglicolato reducido. El inóculo de *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) se extrae del medio enriquecido de tioglicolato y el inóculo de *C. novyi* A (ATCC 7659) se extrae del caldo de glucosa de carne picada, PR II. Los tubos se inoculan por debajo de la superficie de los caldos, a la mayor profundidad posible en el medio. Se ajustan las tapas de inmediato después de la inoculación y los tubos se incuban en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C. Se efectúa la lectura de los tubos para detectar la cantidad de crecimiento después de 18 – 24 h y 42 – 48 h. Todos los organismos muestran crecimiento de traza a denso después de las 48 h.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat. Descripción

221742	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 5 mL
221787	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 mL
221788	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 8 mL
297292	BD BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K ₁ , and Hemin, 10 mL

XIV REFERENCIAS

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.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD o 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