BBL Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K_1 and Hemin

L007509 • Rev. 14 • Outubro 2015

PROCEDIMENTOS DE CONTROLO DE QUALIDADE (Opcional)

I INTRODUÇÃO

O Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K_1 and Hemin é um meio de utilização geral para cultura de microrganismos exigentes e não exigentes.

II PROCEDIMENTO DO TESTE DE DESEMPENHO

1. Efectue a redução dos tubos com o meio, fervendo-os* com as tampas desapertadas. Depois de ferverem, aperte imediatamente as tampas e deixe os tubos arrefecerem à temperatura ambiente.
   *__NOTA:__ Não se recomenda a utilização do forno de microondas.
2. Preparação de inóculos
   Utilize uma cultura com 48 a 72 h em Meio de tioglicolato enriquecido, Meio de carne picada ou colónias provenientes de uma placa de Ágar de sangue ovino a 5% para anaeróbios CDC, que tenham sido transferidas de um tubo previamente reduzido de Meio de tioglicolato enriquecido, e ajuste para uma turvação comparável ao padrão 0,5 de McFarland.
3. Com uma ansa calibrada de 0,01 mL estéril, inocule os tubos a partir do inóculo padronizado para cada um dos microrganismos.
4. Incube os tubos a 35 ± 2°C numa atmosfera aeróbia, com as tampas bem apertadas.
5. Examine os tubos após 18 a 24 h e 42 a 48 h, verificando se ocorreu crescimento.
6. Resultados esperados

Microrganismos de controlo do CLSI (Estirpes ATCC)

**Peptostreptococcus anaerobius*..... Crescimento
(27337)
**Bacteroides vulgatus*..... Crescimento
(8482)
**Clostridium perfringens*..... Crescimento
(13124)

Estirpes adicionais utilizadas

Porphyromonas levii..... Crescimento
(29147)
Clostridium novyi A..... Crescimento
ATCC 7659

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

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 7,0 ± 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 Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K_1 and Hemin (Meio de tioglicolato enriquecido com vitamina K_1 e hemina) é um meio de utilização geral utilizado em procedimentos qualitativos para cultura de microrganismos exigentes e não exigentes, incluindo bactérias anaeróbias e aeróbias, a partir de inúmeros materiais clínicos e não clínicos.

V RESUMO E EXPLICAÇÃO

O Meio de tioglicolato enriquecido consiste em **BBL** Thioglycollate Medium sem o Indicador-135C e suplementado com vitamina K_1 e hemina.[1-3] A utilização do meio líquido enriquecido é recomendada para o isolamento e cultura de microrganismos anaeróbios obrigatórios exigentes ou de crescimento lento presentes nos materiais clínicos.[4,5] Também é recomendado para o isolamento e cultura de uma grande variedade de microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos. O meio é preparado com uma atmosfera anaeróbia e é fornecido em tubos com tampa roscada, em conformidade com as recomendações do CDC.[4] Foi demonstrado que a vitamina K_1 e a hemina são necessárias para o crescimento de alguns anaeróbios.[6,7]

O isolamento de microrganismos a partir de materiais clínicos requer, com frequência, a utilização de meios líquidos enriquecidos associados a meios em placa selectivos, diferenciais e não selectivos utilizados normalmente para isolamento primário. A utilização de meios líquidos de "apoio" reduz a possibilidade de falhar totalmente a identificação de um agente etiológico que esteja presente em número reduzido, cresça lentamente num meio em placa, seja sensível a agentes selectivos ou a condições de incubação desfavoráveis, como por exemplo, anaerobiose insuficiente para a optimização do crescimento de anaeróbios obrigatórios.

VI PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O tioglicolato de sódio, um agente redutor, mantém uma pressão de oxigénio baixa no meio. A vitamina K_1 é essencial para o crescimento de algumas estirpes de *Prevotella melaninogenica*[6], tendo sido também referido que melhora o crescimento de algumas estirpes de *Bacteroides* e de bactérias Gram-positivas não fermentadoras.[8] A hemina é a fonte do factor X que estimula o crescimento de muitos microrganismos.

VII REAGENTES

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K_1 and Hemin

Fórmula* aproximada por litro de água purificada

Digerido pancreático de caseína	17,0 g
Digerido de soja por papaína	3,0 g
Dextrose	6,0 g
Cloreto de sódio	2,5 g
Tioglicolato de sódio	0,5 g
Ágar	0,7 g
L-cistina	0,25 g
Sulfito de sódio	0,1 g
Hemina	0,005 g
Vitamina K_1	0,001 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"[9-12] 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 os tubos em local escuro entre 2 e 8°C. Evitar congelar ou aquecer excessivamente. Abrir apenas quando estiver pronto a utilizar. Minimizar a exposição à luz. Os tubos com meio que forem armazenados conforme indicado no rótulo até ao momento imediatamente anterior à sua utilização, podem ser inoculados até ao fim do prazo de validade e incubados durante os períodos de incubação recomendados. 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.[13,14] 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

Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K_1 and Hemin

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.

A redução do meio líquido para incubação anaeróbia deve ser efectuada antes da inoculação, colocando os tubos com as tampas desapertadas em condições anaeróbias durante 18 a 24 h antes da utilização. Uma forma fácil e eficiente de obter condições anaeróbias adequadas é através da utilização do sistema anaeróbio **BBL GasPak** EZ. Em alternativa,

a redução do meio líquido pode ser efectuada imediatamente antes da utilização, fervendo* os tubos com as tampas desapertadas e arrefecendo-os à temperatura ambiente, com as tampas apertadas, antes da inoculação.

Inocule a amostra no meio seleccionado, imediatamente após a chegada ao laboratório. Com amostras líquidas, os meios em tubo devem ser inoculados com uma ou duas gotas da amostra. As amostras de tecido para a cultura de microorganismos devem ser picadas e moídas em meio líquido reduzido e estéril, tal como o Enriched Thioglycollate Medium. A inoculação é então efectuada tal como para as amostras líquidas. As amostras em zaragatoas podem ser introduzidas no meio líquido após a inoculação do meio em placa. Em alternativa, a zaragatoa pode ser "esfregada" num pequeno volume de meio líquido reduzido e estéril, tal como o Meio de tioglicolato enriquecido, podendo este meio líquido ser utilizado para inocular o meio tal como se tratasse de uma amostra líquida.

As amostras em que se sabe existir ou há suspeita da existência de anaeróbios obrigatórios devem ser inoculadas próximo do fundo do tubo. Incube os tubos numa atmosfera aeróbia, com as tampas bem apertadas, a 35 ± 2°C ou noutra temperatura apropriada.

As culturas em meio líquido devem ser conservadas durante, pelo menos, 1 semana antes de serem eliminadas como negativas.[15]

*__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

O crescimento nos tubos de meio líquido, tal como o Meio de tioglicolato enriquecido, é demonstrado pela presença de turvação quando comparado com um controlo não inoculado.

Se for detectado crescimento, as culturas devem ser examinadas através de coloração Gram e devem ser efectuadas repicagens para meios em placa selectivos e não selectivos. Em caso de suspeita de anaeróbios, devem ser efectuadas repicagens também para meios em placa anaeróbios apropriados.

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.[15]

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.[13,14,16]

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.

XII CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Antes de serem comercializados, todos os lotes de Thioglycollate Medium, Enriched with Vitamin K_1 and Hemin são testados relativamente às características do desempenho. Antes da inoculação, as amostras representativas do lote são submetidas a uma redução, sendo fervidas em banho-maria durante um período mínimo de 10 minutos e, em seguida, arrefecidas. Utilizando uma ansa calibrada de 0,01 mL, os tubos são inoculados com culturas que tenham sido ajustadas para um padrão de turvação 0,5 de McFarland. Os inóculos para a *Porphyromonas levii* (ATCC 29147), o *Clostridium perfringens* (ATCC 13124) e o *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC 27337) são preparados a partir de colónias que cresceram em placas de Ágar de sangue ovino a 5% para anaeróbios CDC e ajustados para a concentração de inóculo correcta em Meio de tioglicolato enriquecido, previamente reduzido. O inóculo para o *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) é colhido de Meio de tioglicolato enriquecido e o inóculo para o *C. novyi* A (ATCC 7659) é colhido de Meio de glicose com carne picada, PR II. Os tubos são inoculados abaixo da superfície do meio líquido, o mais profundamente possível. As tampas são apertadas imediatamente após a inoculação e os tubos são incubados aerobicamente a 35 ± 2°C. A leitura dos tubos é efectuada após 18 a 24 h e 42 a 48 h, verificando o nível de crescimento. Todos os microrganismos apresentam crescimento ligeiro a intenso após um período de 48 h.

XIII APRESENTAÇÃO

N.º de cat.	Descrição
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 BIBLIOGRAFIA

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. Yolken (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. Jimeniz-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.

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

EC REP 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