



**BBL Thioglycollate Medium,
Enriched (with Vitamin K₁ and Hemin),
with Calcium Carbonate**



L007510 • Rev. 05 • Enero 2011

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate (medio enriquecido de tioglicolato con carbonato de calcio) es un medio de uso general para el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes y para el mantenimiento de cultivos de referencia.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Reducir los tubos del medio hirviéndolos* con las tapas flojas. Después de hervir, ajustar las tapas inmediatamente y permitir que los tubos se enfríen a temperatura ambiente.
***NOTA:** No se recomienda utilizar un horno de microondas.
2. Preparación de los inóculos.
Utilizar un cultivo de 48 – 72 h de Enriched Thioglycollate Medium, medio de carne picada o colonias de una placa de agar sangre de carnero al 5 % anaerobio CDC, transferidas a un tubo previamente reducido de Enriched Thioglycollate Medium, y ajustar a una turbidez comparable al patrón 0,5 de McFarland.
3. Utilizar un asa calibrada estéril de 0,01 mL, inocular los tubos a partir del inóculo estandarizado para cada organismo.
4. Incubar los tubos con las tapas flojas a 35 ± 2 °C en atmósfera aerobia con las tapas ajustadas.
5. Examinar los tubos después de 18 – 24 h y 42 – 48 h para detectar crecimiento.
6. Resultados previstos

**Peptostreptococcus anaerobius*..... Crecimiento
ATCC 27337

**Bacteroides vulgatus* Crecimiento
ATCC 8482

**Clostridium perfringens* Crecimiento
ATCC 13124

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 $7,0 \pm 0,2$.
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

Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate es un medio de propósito 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. También se recomienda para el mantenimiento de cultivos de referencia.

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 uso en el aislamiento y cultivo de microorganismos exigentes o de

crecimiento lento obligadamente anaerobios, 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 vacío anaerobio y se proporciona en tubos con tapón de rosca conforme a las recomendaciones de CDC⁴. La vitamina K₁ y la hemina han demostrado empíricamente ser necesarias para el crecimiento de ciertos anaerobios^{6,7}.

El carbonato de calcio facilita el mantenimiento de los cultivos de referencia, al neutralizar los ácidos producidos durante el crecimiento⁸.

El aislamiento de microorganismos a partir de muestras clínicas frecuentemente requiere el uso de medios de caldo enriquecido, además de medios en placas selectivos diferenciales y no selectivos, normalmente utilizados para el aislamiento primario. El uso de medios de "respaldo" líquidos 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 poco favorables; es decir, una anaerobiosis insuficiente para crecimiento óptimo de anaerobios obligados.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Las peptonas de caseína y de soja proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas para favorecer el crecimiento bacteriano. Los extractos de levadura proporcionan las vitaminas del complejo B. El cloruro sódico proporciona iones esenciales. La dextrosa es una fuente de energía.

La acción reductora del tioglicolato sódico y el sulfito sódico liga el oxígeno molecular, que se extrae del medio y mantiene un Eh bajo⁹. Se añade una pequeña cantidad de agar para retardar la absorción del oxígeno, al reducir las corrientes de convección en el medio⁹.

La vitamina K₁ es un requisito de crecimiento para 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 esporas¹⁰. La hemina es una fuente del factor X que estimula el crecimiento de muchos microorganismos.

Se recomienda la incorporación de carbonato de calcio porque ciertos organismos que de otra manera serían exigentes pueden crecer y luego desaparecer rápidamente; así se puede neutralizar el ácido producido durante el crecimiento^{8,11}.

VII REACTIVOS

Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	12,0	g
Digerido papaico de harina de soja	3,0	g
Dextrosa	6,0	g
Extracto de levadura	5,0	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
Fragmentos de mármol	1 por tubo	

*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"¹²⁻¹⁵ 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^{16,17}. Las muestras deben obtenerse antes de que se hayan administrado los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado

Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate

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 condiciones anaerobias durante 18 – 24 h antes de su utilización. Una manera fácil y eficaz para obtener condiciones anaerobias adecuadas es mediante el uso del sistema anaerobio **BD GasPak EZ**. Los medios líquidos también se pueden reducir justo antes de utilizarlos, hirviéndolos* con las tapas flojas y dejándolos enfriar con las tapas ajustadas hasta temperatura ambiente antes de la inoculación.

Inocular la muestra en el medio de preferencia tan pronto como se reciba en el laboratorio. Con las muestras líquidas, los medios en tubos deben ser inoculados 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 with Calcium Carbonate para el cultivo de microorganismos. Luego, la inoculación se realiza como con las muestras líquidas. Las muestras de torunda pueden insertarse en el caldo después de la inoculación de 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 misma manera que 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 o a otra temperatura adecuada.

Los cultivos de caldo deben mantenerse al menos una semana antes de ser descartados como negativos⁸.

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

Control de calidad del usuario

Véase “Procedimientos de control de calidad”.

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de CLSI y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

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 Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate se demuestra por su turbidez en comparación con un control sin inocular.

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

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los anaerobios pueden ser superados en crecimiento por organismos facultativos de crecimiento más rápido. Examinar y someter a tinción de Gram al caldo si el medio en placa no muestra crecimiento. Nunca confiar exclusivamente en los cultivos de caldo para el aislamiento de anaerobios. Algunos anaerobios pueden ser inhibidos por productos metabólicos o ácidos producidos por anaerobios facultativos de crecimiento más rápido⁸.

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 recomendados¹⁶⁻¹⁸.

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 de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate se someten a prueba para determinar sus características de rendimiento. Antes de la inoculación, se reducen muestras representativas del lote hirviéndolas en baño María durante un mínimo de 10 minutos y luego se dejan enfriar. Con un asa calibrada de 0,01 mL se inoculan tubos con cultivos que han sido ajustados a un patrón de turbidez de 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 sangre de carnero al 5% anaerobia CDC y ajustadas a la concentración de inóculo correcta en medio de tioglicolato previamente reducido y enriquecido. El inóculo para *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) se extrae del Thioglycollate Medium, Enriched y el inóculo para *C. novyi* (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 inmediatamente después de la inoculación y se incuban los tubos 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 crecimiento denso después de 48 h.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
297264	BBL Enriched Thioglycollate Medium with Calcium Carbonate, caja de 100 tubos de tamaño K

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. 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.
9. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore.
10. 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.
11. Vera, H.D. 1944. A comparative study of materials suitable for the cultivation of clostridia. J. Bacteriol. 47:59-70.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2007. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
18. 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.



Becton, Dickinson and Company
 7 Loveton Circle
 Sparks, MD 21152 USA
 800-638-8663
 www.bd.com/ds



Benex Limited
 Rineanna House
 Shannon Free Zone
 Shannon, County Clare, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo, BBL and GasPak are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2011 BD