



BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics



L007445 • Rev. 11 • Abril 2015

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics (Campy Thio) (medio de tioglicolato para Campylobacter con 5 agentes antimicrobianos), es un medio de retención para las muestras presuntivas de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* antes de la inoculación del medio sólido.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

A. PRUEBA 1: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

1. Preparar un patrón de McFarland N° 1 a partir de un cultivo de agar de soja **Trypticase** con 5% de sangre de carnero (TSA II) de 24 – 48 h *C. jejuni* subsp. *jejuni*.
2. Diluir el cultivo estandarizado en caldo de soja **Trypticase** a una concentración de 10^{-3} .
3. Inocular un tubo de Campy Thio con 0,1 mL de cultivo diluido. Mezclar con vórtex.
4. Del tubo inoculado de Campy Thio, inocular inmediatamente mediante torunda y luego extendiendo sobre una placa TSA II. Rotular la placa como "pre-refrigeración". Incubar la placa 42 ± 2 °C en un frasco **GasPak** activado con envoltura **CampyPak** y utilizar el sistema **GasPak** EZ Campy. Efectuar la lectura a 36 – 48 h para determinar la cantidad de crecimiento de *C. jejuni* subsp. *jejuni*.
5. Refrigerar inmediatamente los tubos inoculados Campy Thio hasta el día siguiente (16 – 24 h) a 2 – 8 °C. NO UTILIZAR la envoltura ni el frasco **CampyPak**.
6. Después de la refrigeración de un día para el otro, subcultivar el tubo inoculado de Campy Thio. Extender la muestra de torunda y luego extenderla sobre la placa de TSA II. Rotular la placa como "post- refrigeración".
7. Incubar la placa a 42 ± 2 °C en un frasco **GasPak** activado con envoltura **CampyPak** o utilizar el sistema **GasPak** EZ Campy.
8. Efectuar la lectura a 36 – 48 h para determinar la cantidad de crecimiento.

B. PRUEBA 2: Flora mixta

1. Preparar un patrón McFarland N° 1 a partir de un cultivo de flora mixta de 18 – 24 h formado por una mezcla 1:1:1 de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.
2. Preparar diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} a partir de la flora mixta estandarizada.
3. Utilizar la dilución de 10^{-5} , inocular mediante extensión 0,1 mL sobre la placa de TSA II.
4. a. Utilizar la dilución 10^{-4} , inocular uno de los tubos de Campy Thio con 0,1 mL. Mezclar con agitador vórtex.
b. Inocular de inmediato 0,1 mL del Campy Thio inoculado en una placa de agar Campylobacter con 5 agentes antimicrobianos y sangre de carnero al 10% (Campy- BAP) y una placa de TSA II y extender uniformemente mediante un esparcidor de vidrio estéril. Rotular la placa como "pre-refrigeración".
5. Incubar las placas a 42 ± 2 °C en un frasco **GasPak** activado con envoltura **CampyPak** o utilizar el sistema **GasPak** EZ Campy. Efectuar la lectura a 36 – 48 h para determinar la cantidad de crecimiento.
6. Refrigerar inmediatamente el tubo Campy Thio hasta el día siguiente (16 – 24 h) a 2 – 8 °C. NO UTILIZAR la envoltura o el frasco **CampyPak**.
7. Después de la refrigeración del día anterior, subcultivar colocando la punta de una pipeta alrededor de 2 cm debajo de la superficie de Campy Thio y extraer continuamente una muestra a medida que la punta se va acercando lentamente a la superficie. Inocular 0,1 mL en la placa Campy-BAP y una placa TSA II extendiendo con un esparcidor de vidrio estéril. Rotular las placas "post-refrigeración".
8. Incubar las placas a 42 ± 2 °C en un frasco **GasPak** activado con envoltura **CampyPak** o utilizar el sistema **GasPak** EZ Campy.

9. Efectuar la lectura a 36 – 48 h para determinar la cantidad de crecimiento.

C. Resultados esperados

<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> *ATCC™ 33291	Recuperación de muestras de subsp. <i>jejuni</i> "post-refrigeración" en placa TSA II debe ser no más de un punto de crecimiento inferior que el de la muestra "pre-refrigeración".
---	---

El cultivo de flora mixta formado por una mezcla de 1:1:1de:

* <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	La flora mixta debe presentar una inhibición (parcial o completa) en la placa Campy-BAP. Crecimiento (recuentos) de cultivo mixto (10 ⁻⁴) del tubo Campy Thio en placa TSA II debe ser menor en comparación con el crecimiento (recuento) de cultivo mixto (10 ⁻⁵) del tubo de dilución en TSA II.
* <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	
* <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	

*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. 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

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics se recomienda como medio de retención para muestras presuntivas de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* cuando no se puede realizar una inoculación inmediata de agar Campylobacter Agar con 5 antimicrobianos y sangre de carnero al 10%.

V RESUMEN Y EXPLICACION

En 1972, Dekeyser et al informaron acerca del aislamiento de *C. jejuni* a partir de las muestras fecales de pacientes con diarrea y gastroenteritis aguda mediante una técnica de filtración y un medio selectivo con agentes antimicrobianos para eliminar la flora entérica normal¹. Skirrow, en 1977, describió un medio de cultivo selectivo con tres agentes antimicrobianos². Blaser et al informaron acerca del éxito en el aislamiento de *C. jejuni* mediante inoculación directa de muestras fecales en un medio de agar con cuatro agentes antimicrobianos y al inocular este medio mediante muestras de torunda fecales almacenadas en refrigeración durante 8 h en caldo de tioglicolato (agar al 0,16%) con los mismos cuatro agentes antimicrobianos^{3,4}. Un quinto agente antimicrobiano, la cefalotina, se incorporó más tarde para inhibir el organismo *C. fetus* subsp. *fetus* no patógeno⁴.

Campylobacter Thioglycollate Medium se ha recomendado como medio de retención cuando no se encuentran disponibles inmediatamente las instalaciones para realizar la extensión de la muestra y su incubación, cuando se prevé un bajo recuento debido a la demora en el transporte de la muestra al laboratorio y debido a que ya ha transcurrido la etapa aguda de la enfermedad^{5,6}. Para obtener una revisión del estatus de notas taxonómicas vigentes, consultar a Nachamkin⁶.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Campylobacter Thioglycollate Medium es un medio de retención selectiva recomendado para el aislamiento de *C. jejuni* subsp. *jejuni* a partir de muestras clínicas. La incorporación de agentes antimicrobianos, a saber: anfotericina B, cefalotina, polimixina B, trimetoprima y vancomicina, y la refrigeración inhiben adicionalmente la multiplicación de la flora microbiana normal en muestras fecales por lo que facilita al aislamiento de *C. jejuni* subsp. *jejuni*.

VII REACTIVOS

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

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	1,6	g
L-cistina	0,25	g
Sulfito sódico	0,1	g
Anfotericina B	2,0	mg
Cefalotina	15,0	mg
Trimetoprima	5,0	mg
Vancomicina	10,0	mg
Polimixina B	2.500,0	unidades

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

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

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"⁷⁻¹⁰ y las directrices del centro. Antes de desecharlos, esterilizar en autoclave los tubos preparados, los recipientes para muestras y cualquier otro material contaminado.

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.

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^{11,12}. 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

Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics

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.

1. Recogida de la muestra, almacenamiento y subcultivo en medios en placa¹³.

Colocar la torunda rectal alrededor de 1 cm dentro del medio y hacerla girar. Extraer la torunda o bajarla al fondo del tubo y romper el soporte de la torunda de manera pareja al nivel del borde del tubo para permitir un fácil acceso al soporte.

Con las muestras fecales preparar una suspensión de solución salina, licuar con un mezclador mecánico (es decir, un vórtex), y colocar cinco gotas en el medio alrededor de 1 cm por debajo de la superficie. También se pueden tocar todas las áreas de la muestra fecal con una torunda e inocular el medio de la manera en que se describe para la torunda rectal.

Con las muestras diarreicas, colocar cinco gotas del medio alrededor de 1 cm por debajo de la superficie.

Refrigerar el Campylobacter Thioglycollate Medium inoculado de un día para el otro y subcultivar al día siguiente en placas de Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics y sangre de carnero al 10% mediante una pipeta Pasteur insertada alrededor de 2 cm por debajo de la superficie del caldo para extraer continuamente una muestra a medida que la punta se va acercando lentamente a la superficie. No subcultivar en medios no selectivos, puesto que la flora normal todavía es viable.

2. Incubación de medio en placas.

Incubar el medio en placas a 42 °C en una atmósfera rica en dióxido de carbono y con baja concentración de oxígeno. Esta atmósfera puede lograrse utilizando una envoltura generadora de gas desechable **BBL CampyPak** en un frasco **GasPak** 100, tres envolturas en un frasco **GasPak** 150 o utilizando los sistemas **BBL CampyPouch**, **Bio-Bag** Type Cfj o **GasPak EZ** Campy. También se puede lograr la atmósfera mediante la evacuación de frascos ventilados de **GasPak** y remplazándolos con gases de cilindro⁶, o bien utilizando el principio Fortner¹⁴.

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.

X RESULTADOS

Las placas de Campylobacter Agar with 5 Antimicrobics y sangre de carnero al 10% inoculadas de Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics deben examinarse para detectar la presencia de colonias de *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*. Estas colonias, en el agar Campylobacter aparecerán como colonias pequeñas mucoides, por lo general de color grisáceo, planas con bordes irregulares y no hemolíticas a las 24 – 48 h¹⁵.

Las colonias pueden ser apenas visibles a las 18 – 24 h. Una morfología de colonias alternativas que parece estar relacionada con la cepa, está formada por colonias redondeadas de 1 – 2 mm de diámetro, convexas, enteras y relucientes¹⁵. Un pequeño porcentaje de cepas puede tener una apariencia de color marrón claro a levemente rosa¹³.

Las colonias tienden a esparcirse o a agruparse activamente, en especial cuando se aíslan inicialmente a partir de muestras clínicas recientes. Nota: Si las placas se han de analizar después de 24 h de incubación, tratarlas como cultivos anaerobios, es decir, examinar las placas rápidamente y colocarlas nuevamente en una atmósfera de oxígeno reducido de inmediato tras el análisis.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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^{11,12,16}.

XII CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Se notificó que el rendimiento combinado de agar sangre Campylobacter y Campylobacter Thioglycollate Medium, ambos con cinco agentes antimicrobianos, fue un 33% superior que cuando se utilizó solamente el medio en placa y 28% superior que cuando se utilizó solamente el medio de caldo⁴. Luechtefeld et al informaron que el número de resultados positivos no aumentó sustancialmente al mantener muestras fecales de pavo a 4 °C de un día para el otro en Campylobacter Thioglycollate Medium¹⁷.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat. Descripción

- | | |
|--------|---|
| 221747 | BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics, pqt. de 10 tubos de tamaño K |
| 221748 | BD BBL Campylobacter Thioglycollate Medium with 5 Antimicrobics, caja de 100 tubos de tamaño K |

XIV REFERENCIAS

1. Dekeyser, P., M. Gossuin-Detrain, J.P. Butzler, and J. Sternon. 1972. Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *J. Infect. Dis.* 125:390-392.
2. Skirrow, M.B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.* 2:9-11.
3. Blaser, M., J. Cravens, B.W. Powers, and W.L. Wang. 1978. *Campylobacter* enteritis associated with canine infection. *Lancet* 2:979-980.
4. Blaser, M.J., V. Berkowitz, F.M. LaForce, J. Cravens, L.B. Reller, and W-L.L. Wang. 1979. *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.* 91:179-185.
5. Reller, L.B., W-L.L. Wang, and M.J. Blaser. 1979. *Campylobacter* enteritis: *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*. ASCP Check Sample, Microbiology No. MB-99, Commission on Continuing Education, American Society of Clinical Pathologists, Chicago.
6. Nachamkin, I. 1999. *Campylobacter* and *Archobacter*, p. 716-726. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
8. 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.
9. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
10. 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.
11. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
13. Kaplan, R.L. 1980. *Campylobacter*, p. 235-241. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
14. Karmali, M.A., and P.C. Fleming. 1979. Application of the Fortner principle to isolation of *Campylobacter* from stools. *J. Clin. Microbiol.* 10:245-247.
15. Smibert, R.M. 1984. Genus *Campylobacter* Sebald and Veron 1963, 907, p. 111-118. In N.R. Krieg, and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
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.
17. Luechtefeld, N.W., W-L.L. Wang, M.J. Blaser, and L.B. Reller. 1981. Evaluation of transport and storage techniques for isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from turkey fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 13:438-443.

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