



PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD (Opcionales)

I. INTRODUCCION

Fluid Thioglycollate Medium (medio de tioglicolato líquido) es un medio de uso general para el cultivo de anaerobios, microaerófilos y aerobios, y se recomienda como uno de los medios para las pruebas de esterilidad de productos biotecnológicos comerciales.

II. REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Antes de utilizar los tubos, colocarlos con las tapas flojas en agua en ebullición* durante aproximadamente 5 min hasta que se reduzca el medio (se vuelva incoloro). Ajustar las tapas inmediatamente después de retirar los tubos del fuego. Permitir que el medio se enfríe a temperatura ambiente.
***NOTA:** No se recomienda utilizar un horno de microondas.
 - b. A partir de cultivos de caldo de soja **Trypticase** de 24 – 48 h o cultivos en medio enriquecido de tioglicolato para las cepas *Bacteroides* y *Clostridium*, preparar una dilución con una concentración de hasta 100 UFC/mL.
 - c. Con pipetas estériles de 1,0 mL, inocular los tubos con 0,75 de las diluciones.
 - d. Incubar los tubos con las tapas flojas a 30 – 35 °C en una atmósfera aerobia excepto para las cepas de CLSI (*Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), que deben incubarse con las tapas ajustadas.

2. Examinar los tubos de las cepas de control recomendadas por CLSI (con tapas ajustadas) a 18 – 24 y 48 h para determinar el crecimiento. Examinar los tubos de las otras cepas de control (recomendadas por USP) durante un máximo de 3 días para determinar el crecimiento.

3. Resultados previstos

Organismos de control de CLSI (cepas ATCC)

**Bacteroides fragilis* Crecimiento
(25285)

**Staphylococcus aureus* Crecimiento
(25923)

Cepas adicionales utilizadas

(prueba USP para favorecer el crecimiento)

***Staphylococcus aureus* Crecimiento
ATCC 6538

***Pseudomonas aeruginosa* Crecimiento
ATCC 9027

***Clostridium sporogenes* Crecimiento
ATCC 11437

***Clostridium sporogenes* Crecimiento
ATCC 19404

***Bacillus subtilis* Crecimiento
ATCC 6633

***Kocuria rhizophila* Crecimiento
ATCC 9341

***Bacteroides vulgatus* Crecimiento
ATCC 8482

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

** Para verificación del incentivo de crecimiento para uso en pruebas de esterilidad USP.

III. CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar los tubos como se describe en la sección "Deterioro del Producto".
2. Examinar a simple vista los tubos representativos para cerciorarse 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 $7,1 \pm 0,2$.
4. Incubar tubos representativos sin inocular a una temperatura de 20 – 25 °C y 30 – 35 °C y examinar después de 7 días si hay indicios de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV. USO PREVISTO

Fluid Thioglycollate Medium cumple con las especificaciones de la farmacopea de Estados Unidos (*USP*).

Fluid Thioglycollate Medium (FTM) se utiliza para las pruebas de esterilidad de los productos biotecnológicos comerciales y para el cultivo de anaerobios, aerobios y microaerófilos.

V. RESUMEN Y EXPLICACION

El medio de tioglicolato líquido fue diseñado por Brewer para el cultivo rápido de anaerobios y aerobios¹. Fue lanzado al mercado por primera vez, en forma deshidratada por Baltimore Biological Laboratory (BBL) en 1940. Vera le incorporó peptona de caseína en 1944².

Este medio es capaz de favorecer un buen crecimiento de una gran variedad de organismos exigentes, de especies tanto patógenas como no patógenas. El tioglicolato sódico no sólo reduce el potencial de oxidación-reducción, sin también posee la capacidad de neutralizar la actividad antibacteriana de los compuestos con mercurio. Dichas características hacen al FTM especialmente útil para la determinación de la presencia de contaminación en materiales biológicos y de otra clase. La fórmula de **BBL** cumple con los requisitos de la prueba de *USP* para fomentar el crecimiento³.

Fluid Thioglycollate Medium puede utilizarse después de preparado hasta que alrededor del 30% del medio se haya oxidado, como lo indica el color rosa de la resazurina en la superficie. Si prosigue la oxidación, el caldo puede recalentarse una vez al vapor o agua en ebullición, enfriarse y utilizarse.

VI. PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La dextrosa, la peptona, la L-cistina y el extracto de levadura proporcionan los factores de crecimiento necesarios para la multiplicación bacteriana. El cloruro sódico aporta iones esenciales. El tioglicolato sódico es un agente reductor que previene la acumulación de peróxidos, que son letales para algunos microorganismos. La L-cistina también es un agente reductor, dado que contiene grupos sulfidrílo que inactivan los compuestos de metal pesado y mantienen un bajo potencial redox, lo que favorece la anaerobiosis. La resazurina es un indicador de oxidación-reducción: presenta un color rosa con la muestra oxidada y es incolora cuando está reducida. La pequeña cantidad de agar favorece el mantenimiento de un bajo potencial redox al estabilizar el medio contra corrientes de convección, por lo que se mantiene la anaerobiosis en las capas inferiores del medio⁴. La *USP* incluye 5,5 g/L de dextrosa en la fórmula del medio de tioglicolato líquido. La fórmula de **BBL** contiene la forma deshidratada de la dextrosa (5,0 g/L).

VII. REACTIVOS

Fluid Thioglycollate Medium

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína.....	15,0	g
L-cistina	0,5	g
Dextrosa (deshidratada).....	5,0	g
Extracto de levadura	5,0	g
Cloruro sódico.....	2,5	g
Tioglicolato sódico.....	0,5	g
Resazurina.....	0,001	g
Agar.....	0,75	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"⁵⁻⁸ y las directivas 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 según las instrucciones que figuran en la etiqueta. Evitar la congelación y el sobrecalentamiento. No abrir hasta que se vayan a utilizar. 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 de incubación recomendados. 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, consulte los textos correspondientes^{9,10}. 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

Fluid Thioglycollate Medium

Materiales necesarios pero no suministrados

Medios de cultivo auxiliares, reactivos, organismos de control de calidad y el equipo de laboratorio según se requiera.

Procedimiento de análisis

Emplear técnicas asépticas.

Antes de utilizar los tubos, colocarlos con las tapas flojas en agua en ebullición* durante aproximadamente 5 min hasta que se reduzca el medio (se vuelva incoloro). Ajustar las tapas inmediatamente después de retirar los tubos del fuego. Permitir que el medio se enfríe a temperatura ambiente.

Para uso general, inocular las muestras directamente en el medio e incubar los tubos durante un máximo de 7 días a 35 ± 2 °C.

Para las pruebas de esterilidad, deben seguirse las recomendaciones de la USP³ y diversos organismos de control¹¹. Estas fuentes de referencias especifican la proporción de medio y producto que debe utilizarse en las pruebas de esterilidad además de los detalles de la toma de muestras y la interpretación de los resultados de las pruebas. Para las pruebas de esterilidad, es importante que el medio en los recipientes de prueba se reduzca en un nivel suficiente para asegurar la multiplicación de anaerobios obligados y organismos microaerófilos. Si la muestra de prueba causa tanta turbidez en el medio que el crecimiento microbiano no se puede reconocer fácilmente, se debe transferir la muestra a otro medio.

***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

Después de la incubación, el crecimiento se demuestra mediante turbidez, en comparación con un control sin inocular. Los organismos aerobios estrictos tienden a crecer en una capa delgada en la superficie del caldo; los anaerobios obligados crecen sólo en la sección del caldo por debajo de la capa oxidada (color rosa). Al quitar cuidadosamente líquido de niveles diferentes, es posible aumentar la capacidad de separar diferentes especies en un cultivo mixto.

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 el caldo si el medio en placa no muestra crecimiento. Nunca confiar en cultivos de caldo exclusivamente para aislamiento de anaerobios. Algunos anaerobios pueden ser inhibidos por productos metabólicos o ácidos producidos por los anaerobios facultativos de crecimiento más rápido¹².

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.

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 los procedimientos recomendados^{9,10,13}.

XII. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Fluid Thioglycollate Medium se analizan para determinar sus características de rendimiento. Antes de la inoculación, muestras representativas del lote se reducen mediante ebullición en baño María durante aproximadamente 5 min. Después de enfriar, los tubos se inoculan con 0,75 mL de cultivos de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *B. vulgatus* (ATCC 8482), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437 y ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 y ATCC 25923). Los inóculos de *B. subtilis*, *B. fragilis*, *C. sporogenes*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* se diluyen hasta una concentración de hasta 100 UFC (unidades formadoras de colonias) por mL. El inóculo de *B. vulgatus* se prepara a partir de colonias cultivadas en placas de agar 5% sangre de carnero para anaerobios del CDC y se ajusta en medio de tioglicolato sin dextrosa e indicador para obtener una concentración de 10–100 UFC/mL. Se ajustan las tapas inmediatamente después de la inocular los tubos con *B. fragilis* y *S. aureus*; se aflojan las tapas de los demás tubos. Los tubos se incuban a 35 ± 2 °C. Los tubos con *B. fragilis* y *S. aureus* (ATCC 25923) muestran trazas de crecimiento a crecimiento denso dentro de las 48 h de incubación. Los organismos restantes muestran crecimiento de moderado a denso dentro de los 3 días de incubación.

XIII. DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
221195	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, pqt. de 10 tubos de tamaño K
221196	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, caja de 100 tubos de tamaño K
299802	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 8 mL, caja de 100 tubos de tamaño K (etiqueta impresa con chorro de tinta)
220888	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, pqt. de 10 tubos de tamaño A
220889	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, caja de 100 tubos de tamaño A
299803	BD BBL Fluid Thioglycollate Medium, 20 mL, caja de 100 tubos de tamaño A (etiqueta impresa con chorro de tinta)

XIV. REFERENCIAS

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.

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