



PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

Thioglycollate Medium without Indicator-135C (medio de tioglicolato sin indicador 135C) es un medio de uso general para el cultivo de microorganismos, en especial anaerobios obligados.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

- Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - Aflojar las tapas y colocar los tubos en agua en ebullición*, durante 2 – 5 min. Ajustar las tapas inmediatamente después de retirarlos del fuego y permitir que el medio se enfríe a temperatura ambiente antes de su utilización.
***NOTA:** No se recomienda utilizar un horno de microondas.
 - Con pipetas estériles de 1,0 mL, inocular los tubos de medios de tioglicolato con 1,0 mL de diluciones de cultivos de caldo de 18 – 24 h. Utilizar caldo de carbohidratos de carne picada para *Bacteroides fragilis* y caldo de soja **Trypticase** para *Staphylococcus aureus*. La dilución utilizada para *S. aureus* debe ser de hasta 1.000 UFC/mL; la dilución para *B. fragilis* debe contener 10^5 – 10^6 UFC/mL.
 - Incubar los tubos con las tapas ajustadas a 35 ± 2 °C en atmósfera aerobia.
- Examinar los tubos a las 18 – 24 h y a las 48 h para determinar el crecimiento.
- Resultados previstos

Microorganismos	ATCC	Recuperación
* <i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Crecimiento
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Crecimiento

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

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

- Examinar los tubos como se describe en la sección "Deterioro del producto".
- Examinar a simple vista los tubos representativos para cerciorarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
- Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de $7,0 \pm 0,2$.
- Incubar los tubos representativos inoculados a una temperatura de 20 – 25 °C y de 30 – 35 °C y examinar después de 7 días de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

Thioglycollate Medium without Indicator-135C es un medio enriquecido de uso general para la recuperación de una amplia variedad de microorganismos, en especial anaerobios obligados a partir de muestras clínicas y otros materiales.

V RESUMEN Y EXPLICACION

El medio tioglicolato fue descrito originalmente por Brewer¹ como un medio que favorecía el crecimiento de organismos aerobios y anaerobios obligados. El medio tioglicolato original fue modificado para dotarle de la misma calidad nutritiva que el caldo de soja **Trypticase**. Como resultado de la fórmula mejorada, 135C posee un amplio espectro de crecimiento de microorganismos exigentes tanto patógenos como no patógenos². La fórmula original también contenía azul de metileno, pero ahora no se utiliza el indicador Eh. Así se evita la toxicidad posible del indicador y también se facilita una detección temprana del crecimiento.

Thioglycollate Medium-135C se caracteriza por su gran capacidad para favorecer el crecimiento a partir de inóculos mínimos de una amplia variedad de organismos aerobios y anaerobios. Las especies más estrictamente aerobias crecen en la parte superior, mientras que los anaerobios crecen en la profundidad del medio.

Se recomienda Thioglycollate Medium-135C, por consiguiente, como medio de uso general y para el examen de hemocultivo y de todos los demás materiales con posible presencia de diversos organismos aerobios facultativos o anaerobios.

La incorporación de caseína y peptonas de soja permite el crecimiento de ciertos organismos aerobios tales como los miembros del género *Brucella*, los cuales no crecen con facilidad en medio de tioglicolato líquido. Ambos medios favorecen el crecimiento de especies estrictamente anaerobias, tales como *Clostridium novyi*, *C. acetobutylicum*, *Actinomyces bovis* y *Bacteroides*, además de neumococos facultativos, estreptococos, lactobacilos y otras bacterias.

El caldo puede utilizarse añadiéndole 10% de suero para cultivo de *Trichomonas vaginalis*, la espiroqueta de Reiter y otros organismos.

Por dicha razón, el medio se utiliza satisfactoriamente como cultivo de enriquecimiento para numerosos tipos de muestras y también como medio de transporte. Cuando se utiliza con tales fines, se recomienda incorporar CaCO_3 ; de lo contrario, pueden crecer organismos exigentes y luego desaparecer rápidamente; el CaCO_3 sirve para neutralizar el ácido producido durante el crecimiento. Es posible que ocurran un crecimiento y desaparición rápidos de los organismos en ausencia de CaCO_3 , por ejemplo con los cultivos de neumococos, cocos gram negativos, *C. perfringens* y otras bacterias acidossensibles.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La caseína y las peptonas de harina de soja, la dextrosa y la cistina, suministran compuestos nitrogenados y carbonáceos, carbohidratos fermentables y trazas de elementos. El cloruro sódico aporta iones esenciales. El sulfito sódico aporta azufre. El tioglicolato sódico, como agente reductor, reduce el potencial de Eh, por lo que permite el crecimiento de organismos anaerobios obligados en la profundidad del medio. La cantidad relativamente pequeña de agar favorece la acción preventiva de las corrientes de convección en el medio y por lo tanto contribuye al mantenimiento de la anaerobiosis³.

VII REACTIVOS

Thioglycollate Medium without Indicator-135C

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

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

Advertencias y precauciones: Para 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"^{4,7} y las directrices del centro. Después de su utilización, los recipientes para muestras y los 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^{3,8}. 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 without Indicator-135C

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.

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 de obtener las 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 el medio tan pronto como se reciba en el laboratorio. En las muestras líquidas, inocular los medios en tubos con una o dos gotas de la muestra. Las muestras tisulares para el cultivo de microorganismos deben triturarse y pulverizarse en un caldo reducido estéril. 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 se puede "fregar" en un pequeño volumen de caldo reducido estéril, y luego utilizar éste para inocular los medios de la misma manera que con las muestras líquidas.

Las muestras que se conoce o se sospecha que contienen anaerobios obligados deben inocularse cerca de la parte inferior del tubo.

Incubar los tubos con las tapas ajustadas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C, o cualquier otra temperatura adecuada según el tipo de organismo que se cultive, e inspeccionar diariamente durante un máximo de 7 días antes de descartar las muestras como negativas, a menos que se den circunstancias especiales que justifiquen una incubación más prolongada^{3,9}.

*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 se indica por la presencia de turbidez en comparación con un control sin inocular. Se deben realizar subcultivos en medios sólidos adecuados para obtener cultivos puros de aislados que pueden analizarse e identificarse posteriormente.

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 el aislamiento de anaerobios. Algunos anaerobios pueden ser inhibidos por productos metabólicos o ácidos producidos por anaerobios facultativos de crecimiento más rápido⁹.

Con fines de identificación, los organismos deben encontrarse en 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^{3,8,9}.

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 Thioglycollate Medium without Indicator-135C se analizan para determinar sus características de rendimiento. Antes de la inoculación, muestras representativas del lote se reducen mediante ebullición en baño María 2 – 5 min. Después de enfriar, los tubos se inoculan con cultivos de *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Clostridium novyi* (ATCC 7659) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Se extrae el inóculo (1 mL) de *S. aureus* a partir de un cultivo de caldo ajustado a una concentración de hasta 1.000 UFC (unidades formadoras de colonias) por mL. Se extrae el inóculo (1 mL) de *B. fragilis* a partir de un cultivo de caldo ajustado a una concentración de 10^5 – 10^6 UFC por mL. Se extrae el inóculo (asa de 0,01 mL) de *C. novyi* a partir de un cultivo de caldo sin diluir; el inóculo se coloca en el fondo del tubo. Se ajustan las tapas inmediatamente después de la inoculación y los tubos se incuban a 35 ± 2 °C. Se efectúa la lectura de los tubos para determinar la cantidad de crecimiento después de 18 – 24 h y 42 – 48 h. Todos los organismos muestran trazas de crecimiento a crecimiento denso después de las 48 h.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
221199	BD BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, pqt. de 10 tubos de tamaño K
221200	BD BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, caja de 100 tubos de tamaño K C C
221047	BD BBL Thioglycollate Medium without Indicator-135C, 8 mL, caja de 100 tubos de tamaño A

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. Forbes, B.A., D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.

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