

MEDIO TM

Medio de Thayer Martin Modificado

REF B0820743

IVD

→ USO

Medio selectivo que permite el crecimiento de Neisserias patógenas. Está recomendado universalmente para recuperar Neisseria gonorrhoeae y Neisseria meningitidis.

FUNDAMENTO

El diagnóstico cultural de Neisseria gonorrhoeae y Neisseria meningitidis ofrece serias dificultades al bacteriólogo debido a las exigencias nutricionales de estos gérmenes. En los materiales de origen genital (especialmente femenino) la dificultad se incrementa por la abundante flora de contaminación presente en estos especímenes; ello explica las numerosas fallas en la recuperación de gonococo al quedar enmascarado por el desarrollo invasor de la flora saprófita.

El medio de cultivo es altamente nutritivo ya que contiene agar base GC, hemoglobina y el suplemento de enriquecimiento Britalex.

El agregado de la mezcla antimicrobiana V.C.N.T. (vancomicina, colistina, nistatina y trimetoprima) le otorga selectividad ya que inhibe el desarrollo de microorganismos Gram positivos y Gram negativos (aún el swarming de Proteus spp.) y Candida spp. mientras que no tiene efecto inhibitorio en el desarrollo de Neisseria gonorrhoeae y Neisseria meningitidis, las cuales son aisladas en plazos de 18 a 48 horas con una ausencia casi total de contaminantes.

Debido a que los requerimientos nutricionales de Neisseria meningitidis son similares a los de Neisseria gonorrhoeae, este medio puede ser utilizado para aislar el microorganismo principalmente cuando existe otra flora microbiana u organismo de contaminación.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0820743: equipo que contiene:

- GC Agar Base (doble concentración): 3 frascos x 50 ml.
- Solución de Hemoglobina al 2%: 3 frascos x 50 ml.
- Suplemento Britalex: 3 viales.
- Suplemento V.C.N.T.: 3 viales.
- Solvente estéril: 3 viales.

Las fórmulas de los elementos que componen este equipo pueden ser ajustadas y/o suplementadas para cumplir los criterios de desempeño y aceptación del producto, cumpliendo su uso previsto.

GC agar Base: este medio de cultivo se emplea como medio basal para la preparación del medio Thayer Martin (original o modificado) y Agar Chocolate con o sin enriquecimiento para la recuperación de Neisseria gonorrhoeae y Neisseria meningitidis.

FÓRMULA (EN GRAMOS POR LITRO)

Pluripeptona	15.0 g
Almidón	1.0 g
Fosfato Dipotásico	4.0 g
Fosfato Monopotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0 g

pH final: 7,1 ± 0.2

La fórmula puede ser ajustada y/o suplementada para cumplir los criterios de desempeño y aceptación de producto, cumpliendo su uso previsto.

Nota: la fórmula detallada corresponde al GC Agar Base simple concentración. En el Medio TM se encuentra en doble concentración (GC doble concentración).

Solución de Hemoglobina al 2%: solución estéril, lista para usar. Está preparada a partir de una materia prima deshidratada de origen bovino y es un enriquecimiento adecuado para el cultivo de Neisserias, Haemophilus influenzae y estreptococos. Las soluciones de hemoglobina tienen la ventaja que se pueden esterilizar por autoclave pero no son útiles como un indicador de la hemólisis bacteriana.

Suplemento BRITALEX: suplemento estéril liofilizado que se usa para el aislamiento de bacterias nutricionalmente exigentes. Es particularmente recomendado para la preparación de Agar Chocolate Enriquecido a partir de Agar Base GC y hemoglobina para la detección y aislamiento de Neisseria gonorrhoeae y Neisseria meningitidis. También se utiliza como enriquecimiento para el cultivo de Haemophilus influenzae.

FÓRMULA (EN GRAMOS POR LITRO)

Vitamina B12	0.01
L- Glutamina	10.0
CIH Guanina	0.030
Adenina	1.0
Acido P-aminobenzoico	0.013
L-Cistina	1.1
NAD (Coenzima I)	0.250
Cocarboxilasa	0.100
Nitrato Férrico	0.020
CIH Tiamina	0.003
CIH Cisteína	25.9
Glucosa	100.0

INSTRUCCIONES

Reconstituir asépticamente el contenido de un vial con 2,1 ml del solvente del equipo.

Suplemento V.C.N.T.: los antimicrobianos que constituyen este suplemento son utilizados en el medio Thayer Martin Modificado como inhibidores de los organismos contaminantes de la muestra.

FÓRMULA (PARA 1 LITRO DE MEDIO)

Vancomicina	3.0 mg
Colistina	7.5 mg
Nistatina	12500 U
Trimetoprima	5.0 mg

De este modo, por cada mililitro de la solución de V.C.N.T. agregado a 100 ml del medio de cultivo preparado da una concentración final de:

Vancomicina	3 µg/ml
Colistina	7.5 µg/ml
Nistatina	12.5 U/ml
Trimetoprima	5 µg/ml

INSTRUCCIONES

Reconstituir asépticamente el contenido de un vial con 2,1 ml del solvente del equipo.

INSTRUCCIONES:

PREPARACIÓN DEL MEDIO THAYER MARTIN MODIFICADO

Colocar los frascos de GC Agar Base (doble concentración) cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en los mismos.

Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar enfriar (temperatura aproximada 50 °C).

Cuando alcanzan esta temperatura, agregar por cada 50 ml de GC Agar Base (doble concentración): 50 ml de solución de hemoglobina al 2%, 1 ml de Britalex y 1 ml de la mezcla antimicrobiana V.C.N.T. reconstituidas tal como se indicó en los pasos anteriores de estas instrucciones.

Mezclar para homogeneizar. Distribuir en placas de Petri estériles y dejar solidificar.

Importante: los suplementos Britalex y V.C.N.T se agregan en concentración final al 1 % del medio de cultivo.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Todos los constituyentes de este producto son estériles.

- GC Agar Base (doble concentración): color ámbar.
- Solución de Hemoglobina al 2%: color marrón.
- Suplemento Britalex: color blanco-rosado, aspecto homogéneo. Al reconstituirse con el solvente estéril se obtiene una solución incolora-rosada-blanca.
- Suplemento V.C.N.T.: color blanco, aspecto homogéneo. Al re-

constituirse con el solvente estéril se obtiene una suspensión.

- Solvente estéril: incoloro.

Medio de cultivo preparado: Thayer Martin Modificado: color marrón.

ALMACENAMIENTO

- GC Agar Base (doble concentración) y Solución de Hemoglobina al 2%: a 10-35 °C.

- Suplemento Britalex, Suplemento V.C.N.T. y Solvente estéril: a 2-8 °C.
- Nota:** en caso de haber reconstituido los suplementos Britalex y V.C.N.T., pueden ser conservados a -20 °C hasta 3 semanas.

PROCEDIMIENTO

Siembra

En superficie, estriar directamente el material en estudio.

En general podemos detallar:

- 1) Exudados nasales, faríngeos y conjuntivales: las muestras se toman con hisopos pretratados* y se procede a su siembra directa.
- 2) Orinas: se toman los primeros 5 a 10 ml de la orina matinal y se siembra con ansa una gota del sedimento centrifugado.
- 3) Muestras de genitales masculinos: si se efectúa la siembra directa, la muestra se recoge con ansa. Cuando la siembra no se realiza de inmediato, el material debe tomarse con hisopos pretratados* (ver aclaración a continuación), y transportarse en el Medio de Stuart o Amies.
- 4) Muestras de genitales femeninos: las muestras se toman con hisopos pretratados* utilizando espéculos sin lubricantes. Si el material no se procesa directamente, proceder como en 3.
- 5) Muestras rectales: proceder como en 3 y 4.

*Hisopos pretratados: Stuart y colaboradores han empleado hisopos tratados con solución buffer de fosfatos y carbón bacteriológico para el transporte de las muestras conteniendo Neisseria gonorrhoeae. El carbón neutraliza las sustancias inhibitorias contenidas en el agar del medio de transporte. Cooper sugiere que los hisopos tratados de esta manera son capaces de absorber los factores tóxicos presentes en algunos lotes de agar, además pueden absorber los metabolitos tóxicos producidos por los microorganismos.

Preparación de los hisopos: se realizarán sobre varilla de plástico o madera.

No usar alambre común porque el óxido férrico que se forma dificulta o inhibe ciertos microorganismos y a su vez puede contener esporas de anaerobios. Deben ser de algodón y previamente hervidos durante 5 minutos en solución buffer de fosfato Sörensen M/15.

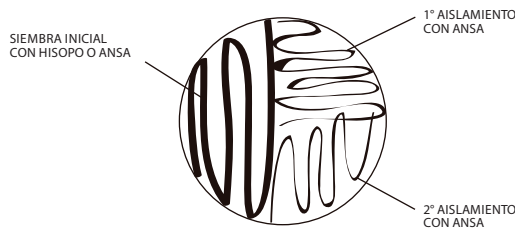
Fosfato Disódico	0.81 g
Fosfato Monosódico	0.18 g
Agua Destilada C. S. P.	100 ml

pH final: 7,4

El exceso de líquido se elimina y luego los hisopos se sumergen en una suspensión al 1% de carbón activado en polvo fino en el mismo buffer.

Los hisopos tratados se secan a 100 °C y luego se esterilizan durante 1 hora a 150 °C con aire caliente. Como alternativa a los hisopos pretratados pueden utilizarse los hisopos COPAN, con medio Stuart o Amies.

Siembra y método de aislamiento: la siembra inicial con hisopo o ansa se practica sobre un tercio de la superficie de la placa, completando el aislamiento con ansa como indica la figura.



Incubación: En atmósfera con 3-7 % de CO₂, a 33-37 °C durante 18-48 horas. En la mayoría de los casos se obtiene un cultivo precoz, y abundante entre las 18 y 24 horas de incubación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Observar las características de las colonias. Las colonias de gonococos y meningococos obtenidas en este medio selectivo son usualmente opacas, grisáceas, convexas, de 1-4 mm de diámetro. Luego de 48 horas de incubación pueden transformarse en colonias mucoides.

CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226	Satisfactorio
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	Inhibición parcial o total
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibición parcial o total
Candida albicans ATCC 10231	Inhibición parcial o total
Proteus mirabilis ATCC 43071	Inhibición parcial o total

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

Información complementaria para la identificación de especies de neisseria:

Para completar el diagnóstico presuntivo realizar:

- a) un extendido del cultivo obtenido, coloreado por el método de Gram: diplococos Gram negativos.
- b) prueba de oxidasa: positiva.

El diagnóstico confirmatorio se realiza mediante pruebas de fermentación de hidratos de carbono y/o técnicas de coagulación o látex.

	N. Gonorrhoeae	N. Meningitidis	Acinetobacter spp.	Neisseria spp.	Moraxella spp.	Moraxella (Branhamella) catarrhalis
Medio Selectivo T.M. (CO ₂)	+	+	-	-	-	-
AGAR CHOCOLATE (CO ₂)	+	+	+	+	+	+
Agar o caldo común	-	-	+	+	V	+
Desarrollo a 22°C	-	-	+	+	V	+
Reacción de oxidasa	+	+	-	+	+	+
Fermentación de glucosa	+	+	-*	V	-	-
Fermentación de maltosa	-	+	-	V	-	-

* Acinetobacter baumannii puede utilizar glucosa por vía oxidativa.

LIMITACIONES

- La mezcla antimicrobiana VCNT difiere de las mezclas empleadas en otros medios selectivos, en la inhibición casi total del desarrollo de contaminantes comunes: Proteus, Candida spp., Neisserias saprófitas, Moraxella (Branhamella) catarrhalis, Staphylococcus spp., etc. De todas maneras deben extremarse las precauciones de asepsia durante la toma de la muestra para evitar una contaminación masiva.
- Si no se cuenta con equipos especiales, (cámara húmeda y atmósfera de CO₂) puede subsanarse el inconveniente, colocando las placas en un recipiente hermético (desecadores, envases de hojalata, etc.), con un algodón humedecido y una vela encendida, que al consumir el oxígeno del ambiente brinda una atmósfera adecuada de CO₂ (3-7 %).
- La temperatura de la estufa de cultivo debe ser de 33-37°C para el mejor desarrollo de las Neisserias patógenas. A esta temperatura desarrollan perfectamente en los otros medios, todos los demás gérmenes que habitualmente se cultivan a 37°C.
- No se recomienda el empleo del medio selectivo TM para la siembra de LCR, ya que de estar presentes Neisseria meningitidis o Neisseria gonorrhoeae será en cultivo monomicrobiano. En tales casos se recomienda el Agar Chocolate suplementado con Britalex (Britania).

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y

manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.

- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

REFERENCIAS

- Stuart, R D., Toshach, S. R., Patsula, T. M.: Canad. J. Pub. Hlth (1954) 45, 73.
- Thayer, J. D., Martin, J. E.: Pub. Hlth. rep. (1964) 979, 49-57.
- Seminar on Venereal Diseases Washington D.C. USA (1965), WHO – PAHO.
- Thayer, J. D., Martin, J. E.: Pub. Hlth. Rep. (1966) 81, 559.
- U.S. Department of Health Education and Welfare CDC Atlanta Georgia 30333.
- Procedures for use by the laboratory in the isolation and identification of Neisseria gonorrhoeae.
- Seth, A.: Brit. J. Vener. Dis (1970) 46,201-202.
- Douglas S. Kellogg, JR; King K. Holmes, Gilbert A. Hill. 1976. Laboratory Diagnosis of Gonorrhea, Cumitech 4, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Alan T. Evangelista, Henry R. Beilstein. 1993. Laboratory Diagnosis of Gonorrhea, Cumitech 4A, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Isenberg, H.D., ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. I & II. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Forbes, B.A., et al. 1998. Bailey and Scott’s Diagnostic Microbiology, 10th ed. C.V. Mosby Company, St. Louis, MO.
- Murray P.R., Baron, Pfaller, Tenover and Tenover. 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento.
Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

AUTORIZACIÓN ANMAT

PM-1292-40
Dir. Técnico: Bioq. Alejandro Rossi

SÍMBOLOS UTILIZADOS

 DIAGNÓSTICO IN VITRO	 CÓDIGO N°	 LOTE N°	 ESTÉRIL
 ELABORADOR	 N° DE DETERMINACIONES	 INSTRUCCIONES DE USO	 FECHA DE VENCIMIENTO
			 LÍMITE DE TEMPERATURA