AGAR TCBS

(Kit de 1 a 20 unidades de medio de cultivo preparado en placa de 90mm x 15mm, biplaca de 90mm x 15mm y placa de 60mm x 15mm. Listos para usar)

APLICACIÓN Y USO

TCBS (Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa): Es un medio selectivo para el aislamiento de vibrios patógenos.

FÓRMULA TÍPICA X LITRO (COMPONENTES)

Extracto de levadura	5.0 gr
Peptona bacteriológica	10.0 gr
Tiosulfato de sodio	10.0 gr
Citrato de sodio	10.0 gr
Sales Biliares	8.0 gr
Sucrosa	20.0 gr
Cloruro de sodio	10.0 gr
Citrato férrico	1.0 gr
Azul de bromotimol	0.04 gr
Azul de timol	0.04 gr
Agar	14.0 gr

pH 8.6 +/- 0.2 a 25ºC

MATERIALES ADICIONALES NO SUMINISTRADOS

Asa, mechero, Incubadora

METODOLOGÍA

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El agar TCBS es altamente selectivo para el aislamiento de V. cholerae y V. parahaemolyticus así como otros vibrios. La inhibición de las bacterias GRAM positivas, se logra mediante la incorporación de bilis de buey, que es una sustancia natural que contiene una mezcla de sales biliares, y colato de sodio, una sal biliar pura.

El tiosulfato de sodio sirve como fuente de azufre, y en combinación con citratao férrico, detecta la producción de sulfuro de hodrógeno. La sacarosa se incluye como carbohidrato fermentable para el metabolismo de los vibrios. El pH alcalino del medio, mejora la recuperación de V. cholerae. El azul de timol, y el azul de bromotimol, se incluyen como indicadores de cambios de pH.

La mayoría de Enterobacterias encontradas en heces, son inhibidas totalmente como mínimo en 24 horas. Un leve crecimiento de especies de Proteus y E. faecalis puede ocurrir, pero las colonias son fácilmente reconocibles comparando con las colonias de Vibrio. No requiere aditivos especiales como sangre; es por esto que muestra una ventaja sobre el Agar Lauryl Sulfato Telurito el cual requiere más aditivos después de la esterilización. Aparte de este factor conveniente, también posee características de crecimiento superiores para especies de Vibrio comparado con el medio Telurito. Mientras que son inhibidos Non-Vibrios, se promueve el rápido crecimiento de Vibrios patógenos después de incubación por 24 horas a 35ºC. Para el aislamiento de otros Vibrios a partir de muestras ambientales, la incubación a bajas temperaturas de 20ºC y 30ºC son necesarias.

CRITERIOS DE DESEMPEÑO Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

- ✓ Medio preparado: verde, sólido, translúcido.
- ✓ Examine la fecha de vencimiento y signos de deterioro de las placas antes de su uso.
- ✓ Observe cualquier evidencia de contaminación, mal llenado, cambios de color y signos de deshidratación y pérdida de volumen.
- ✓ Después de abierto el Rack de 10 unidades, debe usarse durante la semana siguiente para evitar posible contaminación.
- ✓ La identificación de varias especies de Vibrio en Agar TCBS es presuntiva y pruebas adicionales son necesarias para confirmación.
- ✓ Colonias amarillas en Agar TCBS dan reacciones insatisfactorias en la prueba de la oxidasa.
- ✓ Las colonias tomadas desde el Agar TCBS son "pegajosas" y reaccionan pobremente en pruebas de aglutinación. Por lo tanto, Subcultivos en Agar Nutritivo son necesarios antes de las pruebas de aglutinación.
- ✓ Algunas cepas de Vibrio vulnificus producen mejor recuperación a 30ºC.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Atemperar el producto antes de su uso.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

- ✓ La vida media de los medios de cultivo varía considerablemente. Es importante mantenerlos lejos de la luz solar directa, nunca congelarlos o permitir que tengan temperaturas menores de 4°C a 12ºC hasta por 5 meses. Deben permanecer con su estuche plástico, el cual tiene una permeabilidad al vapor de agua del 15%, permitiendo que el agua no se condense y tampoco se deshidrate el medio por perdida de agua.
- ✓ Los medios de cultivo MDM Científica son probados en su pH final recomendado por tipo de agar. Cada lote se almacena en cuarentena hasta que una muestra de cada uno es incubada por 3 días y al hacer lectura el resultado, debe ser negativo para todo tipo de microorganismos, asegurando en casi la totalidad de los lotes su esterilidad.
- ✓ Se realizan pruebas de "Desempeño de crecimiento, productividad y Selectividad", con cepas ATCC, de acuerdo a las recomendaciones de la CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) para cada tipo de medio, asegurando de esta manera la calidad nutritiva y estabilidad de todos los lotes producidos.

TIPO DE MUESTRA

Hisopado rectal, materia fecal, vómito, (pescado en industria).

PROCEDIMIENTO

- ✓ El medio de cultivo preparado debe retirarse de su empaque plástico, y debe ser atemperado unos 30 minutos a temperatura ambiente antes de su uso, nunca flamearlo. Antes de usarlo, siempre debe ser marcado o identificado apropiadamente en su parte posterior, con los detalles de la muestra de manera que no tape la parte del fondo del medio de cultivo para visualizar si se presenta contaminación.
- ✓ A partir del material en estudio, Inocule el medio usando une técnica aséptica y apropiada de acuerdo a lo requerido, e incube bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad, ambiente de aerobiosis, durante 24-48 horas, entre 35 y 37 °C.
- ✓ Examine el medio de cultivo después de la incubación para observar evidencia de crecimiento y realice las técnicas apropiadas de identificación, de acuerdo a los protocolos establecidos.
- ✓ La complejidad de la composición de este medio para lograr una uniformidad del crecimiento es un estándar difícil para conservar, ya que varias investigaciones han mostrado variación entre lotes de Agar TCBS hechos por diferentes marcas.
- ✓ El control de calidad por los fabricantes de este medio es especialmente importante porque la inhibición satisfactoria de la flora intestinal normal y la carencia en la inhibición de ciertas especies de Vibrio es muy crítica. Este medio de cultivo reúne todos los criterios como producto satisfactorio.
- ✓ Muestra de materia fecal o un subcultivo a partir de un medio de enriquecimiento, por ejemplo, Agua Peptonada Alcalina sobre la superficie del Agar TCBS. Incubar de 18 a 24 horas a 35ºC para muestras clínicas o a bajas temperaturas para muestras ambientales.
- ✓ Los cultivos positivos en TCBS deberían ser examinados rápidamente después de sacarlos de la incubadora porque las colonias amarillas de cultivos de Vibrio por ejemplo, Vibrio cholerae pueden cambiarse a color verde cuando permanecen a temperatura ambiente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Apariencia de las colonias sobre el medio (después de 24 horas de incubación a 35ºC):

Microorganismos	Colonias
Vibrio cholerae El TOR	Amarillas 2-3mm
Vibrio parahaemolyticus	Azul - verdosa, 3-5mm
Vibrio alginolyticus	Amarillas. 3-5mm
Vibrio metschnikovii [10]	Amarillas, 3-4mm
Vibrio fluvialis [11]	Amarillas, 2-3mm
Vibrio vulnificus [12]	Azul - verdosa, 2-3mm
Vibrio mimicus [13]	Azul - verdosa, 2-3mm
Enterococcus species	Amarillas, 1mm
Proteus species	Amarilla - verdosa, 1mm
Pseudomonas species	Azul - verdosa, 1mm

Algunas cepas de *Aeromonas hydrophila* crecen produciendo colonias amarillas, pero *Plesimonas shigelloides* usualmente no crece bien en TCBS.

CONTROL DE CALIDAD

Microorganismo/ATCC	Crecimiento	Color de la colonia
Vibrio cholerae El TOR ATCC 14033	Bueno	Amarilla
V. parahaemolyticus ATCC 17802	Bueno	Azul verde
E. coli ATCC 25922	Inhibido	No aplica

INTERVALOS DE REFERENCIA: No Aplica

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- ✓ La inoculación de un medio de cultivo con bacterias, deliberadamente o accidentalmente, lleva al crecimiento rápido de estos en el medio, y altas concentraciones de cualquier microorganismo son potencialmente peligrosos, y deben ser descartados de manera segura y por métodos aprobados, como la inactivación con amonio cuaternario, descartando luego los agares en sus cajas contenedoras en doble bolsa roja para luego descartarlo como material de riesgo biológico; o por autoclavado, sin remover previamente el agar.
- ✓ Todos los medios de cultivo deben ser manipulados por personal calificado y que hayan sido entrenados en procedimientos y técnicas microbiológicas.

TECNOLOGÍA O EQUIPO UTILIZADO: No Aplica

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farmer, Hickman-Brenner and Kelly. Manual of Clinical Microbiology.
2. Kobayashi, Enomoto, Sakazaki and kuwahara. J. Bacteriol. 18:387.
3. Dewitt, Gangarosa, Huq and Zarifi. Am J. Trop. Med 20:685.

INFORMACIÓN TÉCNICA A PARTIR DE BASE DESHIDRATADA

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Nombre: Anna María Alzate Vélez	Nombre: Daniela Muñoz Toro	Nombre: Anna María Alzate Vélez
Cargo: Directora técnica	Cargo: Coordinadora Control de calidad	Cargo: Directora técnica
Fecha: 13/01/2025	Fecha: 14/01/2025	Fecha: 14/01/2025
Firma: 	Firma: 	Firma: 