

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCIÓN

BD BBL Seven H11 Agar (agar Seven H11) es un medio de cultivo para el aislamiento y cultivo de micobacterias.

II REALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Asegurarse de que las placas estén libres de humedad antes de la inoculación.
 - b. Extender en las placas para aislamiento un cultivo diluido para obtener 10^3 – 10^4 UFC.
 - c. Incubar las placas a una temperatura de 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.
2. Examinar las placas después de 7–21 días para determinar el crecimiento y la pigmentación.
3. Resultados previstos

Organismos	Cepas ATCC	Recuperación
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Crecimiento de moderado a denso
* <i>Mycobacterium kansasii</i> Grupo I	12478	Crecimiento
* <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , Grupo II	19981	Crecimiento
* <i>Mycobacterium intracellulare</i> , Grupo III	13950	Crecimiento
* <i>Mycobacterium fortuitum</i> , Gruppe IV	6841	Crecimiento

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

NOTA: Deben ser controladas por los usuarios, según CLSI M22-A3.

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar las placas como se describe en la sección "Deterioro del producto".
2. Examinar visualmente las placas representativas para asegurarse 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 $6,6 \pm 0,2$.
4. Tomar en cuenta la firmeza de las placas durante el procedimiento de inoculación.
5. Incubar las placas representativas sin inocular a 35 ± 2 °C durante 72 h y examinar para detectar contaminación microbiana.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

BD BBL Seven H11 Agar se utiliza en procedimientos cualitativos para el aislamiento y cultivo de micobacterias. Las placas se llenan bien para reducir los efectos de la deshidratación durante la incubación prolongada.

V RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Se han diseñado varios medios para el cultivo de micobacterias. Los primeros medios fueron fórmulas a base de huevo, e incluían los medios Lowenstein-Jensen y Petragnani. Dubos y Middlebrook desempeñaron un papel clave en el desarrollo de un número de fórmulas con ácido oleico y albúmina como ingredientes principales para favorecer el crecimiento de bacilos tuberculosos y proteger los organismos contra diversos agentes tóxicos¹. Posteriormente, Middlebrook y Cohn mejoraron la fórmula del agar ácido oleico-albúmina y obtuvieron un crecimiento más rápido y abundante de especies de *Mycobacterium* en su medio designado como 7H10^{2,3}.

Cohn et al modificaron la fórmula del agar 7H10 añadiendo un gramo de digerido pancreático de caseína por litro para mejorar el crecimiento de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que aparentemente crecían poco (o no crecían en absoluto) en agar 7H10 y otros medios de aislamiento convencionales⁴. Esta fórmula se denominó Seven H11 Agar. En un estudio realizado por Cohn et al. de 96 aislados clínicos, 13 no crecieron en el medio 7H10 en las primeras tres semanas. 10 de los 13 cultivos crecieron en Seven H11 a las tres semanas; los otros tres necesitaron unas tres semanas más de incubación para lograr un crecimiento visible⁴.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

BD BBL Seven H11 Agar contiene una variedad de sales inorgánicas que proporcionan sustancias esenciales para el crecimiento de micobacterias. El citrato sódico, convertido en ácido cítrico, retiene determinados cationes inorgánicos en la solución. El glicerol es una fuente abundante de carbono y energía. El digerido pancreático de caseína es una fuente rica de nitrógeno para el crecimiento de bacilos tuberculosos y proporciona un número de factores de crecimiento adicionales¹. El ácido oleico, además de otros ácidos grasos de cadena larga, puede ser utilizado por los bacilos tuberculosos y desempeña un papel importante en el metabolismo de las micobacterias. La catalasa destruye los peróxidos tóxicos que pudieran estar presentes en el medio. El efecto principal de la albúmina es la protección de los bacilos tuberculosos contra agentes tóxicos y, por consiguiente, mejora su recuperación en el aislamiento primario. La inhibición parcial de bacterias se logra mediante la presencia del colorante verde malaquita.

VII REACTIVOS

BD BBL Seven H11 Agar

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	1,0 g	Albumina bovina V	5,0 g
Sulfato magnésico	0,05 g	Catalasa	3,0 mg
Citrato férrico de amonio	0,04 g	Piridoxina	1,0 mg
Citrato sódico	0,4 g	Sulfato de zinc	1,0 mg
Sulfato de amonio	0,5 g	Sulfato de cobre	1,0 mg
Glutamato monosódico	0,5 g	Biotina	0,5 mg
Fosfato disódico	1,5 g	Cloruro de calcio	0,5 mg
Fosfato monopotásico	1,5 g	Verde malaquita	0,25 mg
Agar	13,5 g	Acido oléico	0,06 mL
Cloruro sódico	0,85 g	Glicerol	5,0 mL
Dextrosa	2,0 g		

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

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Si se observa humedad en exceso, invertir la parte inferior sobre una tapa desplazada y permitir que se seque al aire para impedir que se forme una barrera estanca entre la parte superior y la inferior de la placa durante la incubación.

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 directrices del centro. Después de su uso, las placas preparadas, los recipientes de muestra y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Se requiere la utilización de prácticas y procedimientos de seguridad biológica de nivel 2 y equipo e instalaciones para contención cuando se manipulen muestras clínicas sin producir aerosoles, como en la preparación de frotis acidorresistentes. Todas las actividades que generen aerosoles deben llevarse a cabo en un gabinete de seguridad biológica de clase I o II. Se requiere la utilización de prácticas de seguridad biológica de nivel 3 y equipo e instalaciones para contención en las actividades de laboratorio que incluyan la propagación y manipulación de cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Los estudios en animales también requieren la implementación de procedimientos especiales⁷.

Instrucciones para el almacenamiento

Las placas se deben almacenar en un lugar oscuro a 2–8 °C. No congelar ni sobrecalentar. No abrir hasta que se vayan a utilizar. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Las placas preparadas, almacenadas en su envase original a 2–8 °C hasta momentos antes de su utilización, pueden inocularse hasta su fecha de caducidad e incubarse durante los períodos de incubación recomendados (un máximo de 8 semanas para los medios micobacteriológicos). Dejar que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto

No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se han diseñado diversos recipientes y torundas para recolectar las muestras. Las muestras deben obtenerse antes de administrar el tratamiento antimicrobiano. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio. Se han diseñado varios medios de conservación o sistemas de transporte tales como los productos de recogida y transporte de muestras **BD BBL** para prolongar la supervivencia de los microorganismos cuando se prevé una demora significativa entre la recogida y el cultivo definitivo.

Consultar los textos correspondientes para conocer los detalles relativos a los procedimientos de recogida y manipulación de muestras^{9,10}.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado

BD BBL Seven H11 Agar (Deep Fill)

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

La superficie del agar debe estar lisa y húmeda, pero sin humedad en exceso.

Los procedimientos de prueba son los recomendados por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para el aislamiento primario de muestras que contengan micobacterias¹¹. Se recomienda la solución de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH) como agente descontaminante y digestivo suave pero eficaz. Estos reactivos se proporcionan en el equipo de digestión/descontaminación de muestras micobacterianas **BD MycoPrep**. Para obtener instrucciones detalladas de descontaminación y cultivo, consultar la referencia apropiada⁹⁻¹².

Después de la inoculación, mantener las placas protegidas de la luz y colocarlas, con el lado del medio hacia abajo, en un sistema **BD GasPak EZ** o cualquier otro sistema adecuado que proporcione una atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono e incubar a 35 ± 2 °C.

NOTA: Los cultivos de lesiones cutáneas presuntivas de *M. marinum* o *M. ulcerans* deben incubarse a 25–33 °C para el aislamiento primario; los cultivos presuntivos de *M. avium* o *M. xenopi* muestran crecimiento óptimo a una temperatura de 40 a 42 °C¹¹. Incubar un cultivo duplicado a 35–37 °C.

Control de calidad del usuario

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional aplicable, 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

Se debe realizar la lectura de los cultivos dentro de los 5–7 días después de la inoculación y una vez a la semana posteriormente hasta un máximo de 8 semanas.

Para efectuar la lectura de las placas, invertir las en la platina de un microscopio de disección. Efectuar la lectura a 10–60x con luz transmitida. Realizar un barrido rápido a 10–20x para determinar la presencia de colonias. Un aumento mayor (30–60x) es útil para observar la morfología de las colonias, es decir, forma espiral semejante a una cuerda.

Registrar las observaciones¹¹:

1. Número de días requeridos para que las colonias puedan ser visibles macroscópicamente.
2. Número de colonias:
Sin colonias = Negativo
Menos de 50 colonias = Recuento real
50 a 100 colonias = 1+
100 a 200 colonias = 2+
Casi confluyente (200 a 500) = 3+
Confluyente (más de 500) = 4+
3. Producción de pigmento
Blanco, crema o beige = No cromógeno (NC)
Limón, amarillo, naranja, rojo = Cromógeno (Ch)

Los frotis con tinción pueden mostrar bacilos acidorresistentes que se reseñan solamente como “bacilos acidorresistentes”, a menos que se realicen pruebas definitivas¹¹.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Este medio está diseñado para aislamientos primarios. Sin embargo se recomienda un cultivo puro para realizar las pruebas bioquímicas y procedimientos serológicos. Consultar los textos correspondientes para obtener más información⁹⁻¹³.

XII CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

En un estudio realizado por Rastogi et al. en el Instituto Pasteur, los resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos de 7H11 Agar fueron comparables con un método radiométrico mediante el uso del sistema **BD BACTEC** 460TB. Además, la investigación justificó la selección de 7H11 Agar en lugar de Lowenstein-Jensen Agar para las pruebas convencionales de sensibilidad a antibióticos¹⁴.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat. Descripción

221870 **BD BBL** Seven H11 Agar (Deep Fill)

XIV REFERENCIAS

1. Dubos, R.J., and G. Middlebrook. 1947. Media for tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* 56:334–345.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am. J. Pub. Health.* 48:844–853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, W.E. Dye, W.B. Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand.* 38:66–81.
4. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.* 98:295–296.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, 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. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th 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. Forbes, B.A., D.F. Sahn, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. Metchock, B.G., F.S. Nolte, and R.J. Wallace, Jr. 1999. *Mycobacterium*, p. 399–437. *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.
11. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory*. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
12. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Soubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Isenberg, H.D., F.D. Schoenknecht, and A. von Graevenitz. 1979. Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Rastogi, N., K.S. Goh, and H.L. David. 1989. Drug susceptibility testing in tuberculosis: a comparison of the proportion methods using Lowenstein-Jensen, Middlebrook 7H10 and 7H11 Agar media and a radiometric method. *Res. Microbiol.* 140:405–417.

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite www.bd.com.



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.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.