



PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar (agar Middlebrook and Cohn 7H10) es un medio de cultivo para el cultivo de micobacterias.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

A. Procedimiento para la preparacion de inoculos

1. Inocular agares inclinados del medio Lowenstein-Jensen con cultivo de referencia de las cepas micobacterianas pertinentes utilizando agujas de inoculación estériles.
2. Incubar los tubos con las tapas flojas en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono a 35 ± 2 °C hasta que se obtenga crecimiento denso (normalmente entre 2 y 3 semanas).
3. Extraer el crecimiento con un aplicador afilado estéril, retirando con cuidado las células de la superficie del medio para no incluir el medio de cultivo con la extracción de células.

a. Para *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:

- (1) Transferir el crecimiento a 5,0 mL de caldo Middlebrook 7H9 con glicerol en un tubo de vidrio estéril con tapa a rosca con microesferas de vidrio estériles.
- (2) Mezclar bien en vórtex (varios minutos) hasta que la suspensión esté libre de grumos de gran tamaño.
- (3) Comparar esta suspensión con un patrón N° 1 de McFarland realizado con nefelómetro. La suspensión debe ser más turbia que el patrón.
- (4) Colocar el tubo en una gradilla durante unas 2 – 3 h a temperatura ambiente para permitir que la precipitación de las partículas grandes en el fondo.
- (5) Transferir el sobrenadante a un contenedor estéril.
- (6) Ajustar la turbidez de la suspensión a un patrón N° 1 de McFarland agregando lentamente el caldo Middlebrook 7H9 estéril con glicerol. Mezclar bien.
- (7) Diluir a 10^5 UFC/mL antes de usar. Mezclar bien e inocular mediante extensión el medio de prueba utilizando un asa calibrada de 0,01 mL.

b. Para todas las demás cepas micobacterianas:

- (1) Transferir el crecimiento a un tubo de centrifugado con tapón roscado de 50 mL con 8 – 12 microesferas de vidrio estériles (2 mm de diámetro) y 5 mL de diluyente micobacteriano preparado de la siguiente manera:
 - Mezclar los siguientes elementos en un frasco de 1 L y ajustar el pH, usando hidróxido sódico 1N, a 6,7 a 7,0.

Albúmina bovina (sin ácidos grasos).....	1,0 g
Polisorbato 80	0,1 mL
Agua purificada	500 mL
 - Esterilizar mediante filtración de membrana (filtro de 0,2 μ)
 - Dosificar asépticamente dosis de 5,5 mL en tubos estériles con tapa a rosca.
- (2) Emulsionar el crecimiento micobacteriano en la pared lateral del tubo de centrifugado con tapa a rosca utilizando un aplicador. Mezclar el crecimiento con el diluyente.
- (3) Tapar el tubo y agitar en vórtex aproximadamente 10 min hasta que el crecimiento esté bien suspendido y libre de grumos grandes.
- (4) Agregar 15 mL de diluyente micobacteriano y mezclar bien.
- (5) Comparar esta suspensión con un patrón N° 1 de McFarland realizado con nefelómetro. La suspensión debe ser más turbia que el patrón.
- (6) Colocar el tubo en una gradilla durante unas 2 – 3 h a temperatura ambiente para permitir la precipitación de las partículas grandes en el fondo.
- (7) Aspirar el sobrenadante y transferirlo a un recipiente estéril. La suspensión debe ser más turbia que el patrón N° 1 de McFarland y no debe contener partículas grandes. Si todavía se ven partículas grandes, mezclar y dejar reposar una hora más.
- (8) Ajustar la turbidez de la suspensión a un patrón N° 1 de McFarland, añadiendo lentamente diluyente micobacteriano estéril. Mezclar bien.
- (9) Colocar alícuotas de la suspensión en frascos para congelador etiquetados con la identificación de los organismos y la fecha de preparación.
- (10) Congelar las suspensiones colocando los frascos en un congelador de baja temperatura a -60 °C. Los frascos pueden almacenarse hasta un máximo de 6 meses.

- (11) Para utilizarlos, retirar el frasco congelado del congelador, y realizar una descongelación rápida de su contenido colocando el frasco en un baño María de 30–35 °C. Diluir a 10⁵ UFC/mL antes de usar. Mezclar bien e inocular mediante extensión el medio de prueba utilizando un asa calibrada de 0,01 mL.

B. Procedimiento de análisis del medio

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Asegurarse de que las superficies de agar estén libres de humedad antes de la inoculación.
 - b. Utilizar asas calibradas estériles desechables de 0,01 mL, inocular los recipientes de prueba con cultivos micobacterianos preparados como se ha descrito anteriormente.
 - c. Incubar los recipientes con las tapas flojas a 35 ± 2 °C en atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.
 - d. Incluir los tubos del agar Middlebrook 7H10 anteriormente analizados como controles.
2. Examinar los recipientes después de 7, 14 y, si es necesario, 21 días, para detectar crecimiento, selectividad y pigmentación.
3. Resultados previstos

Organismos	ATCC	Recuperación
* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	25177	Crecimiento
* <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> , grupo 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 los tubos como se describe en la sección “Deterioro del producto”.
2. Examinar visualmente los tubos representativos para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
3. Incubar tubos representativos sin inocular a una temperatura de 20 – 25 °C y 30 – 35 °C y examinar después de 7 días en busca de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar se utiliza en procedimientos cualitativos para el aislamiento y cultivo de micobacterias.

V RESUMEN Y EXPLICACION

Los medios de cultivo de micobacterias han evolucionado mucho durante los últimos años. Los primeros medios fueron fórmulas a base de huevo, e incluían los medios Lowenstein-Jensen Medium y Petraghani. Dubos y Middlebrook contribuyeron decisivamente al desarrollo de diversas fórmulas que contenían ácido oleico y albúminas como elementos clave para favorecer el crecimiento de los bacilos tuberculosos y proteger los organismos contra varios agentes tóxicos¹. Posteriormente Middlebrook y Cohn mejoraron la fórmula del agar ácido oleico-albúmina y obtuvieron un crecimiento más rápido y más abundante de la especie *Mycobacterium* en su medio designado como 7H10^{2,3}. Se ha reseñado que en el medio 7H10 crecen menos contaminantes que en el medio a base de huevo utilizado frecuentemente para el cultivo de micobacterias⁴.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Middlebrook and Cohn 7H10 Agar contiene varias 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 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. 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 catalasa destruye los peróxidos tóxicos que pudieran estar presentes en el medio. La inhibición parcial de bacterias se logra mediante la presencia del colorante verde malaquita.

VII REACTIVOS

BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Sulfato magnésico	0,05	g
Citrato férrico de amonio	0,04	g
Citrato sódico	0,4	g
Sulfato de amonio	0,5	g
Glutamato monosódico	0,5	g
Fosfato disódico	1,5	g
Fosfato monopotásico	1,5	g
Agar	13,5	g
Cloruro sódico	0,85	g
Dextrosa	2,0	g
Albúmina bovina (Fracción V).....	5,0	g
Catalasa	3,0	mg
Piridoxina	1,0	mg
Sulfato de zinc	1,0	mg
Sulfato de cobre.....	1,0	mg
Biotina	0,5	mg
Cloruro de calcio	0,5	mg
Verde malaquita	0,25	mg
Acido oleico	0,06	mL
Glicerol.....	5,0	mL

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

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los tubos y frascos 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 directrices del centro. Antes de desecharlos, esterilizar en autoclave los tubos preparados, los recipientes para muestras y cualquier otro material contaminado.

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

Al recibir los tubos y frascos, 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 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 ni los frascos 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 correspondientes⁹⁻¹¹. 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: Middlebrook and Cohn 7H10 Agar

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: Emplear técnicas asépticas.

Los procedimientos de análisis son los recomendados por los Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para el aislamiento primario de muestras que contengan micobacterias.⁹ Se recomienda N-Acetil-L-cisteína-hidróxido sódico (NALC-NaOH) como agente descontaminante y digestivo suave pero eficaz. Estos reactivos se proporcionan en el equipo de digestión/descontaminación de muestras micobacterianas **BBL MycoPrep**. Para obtener instrucciones detalladas de descontaminación y cultivo, consultar la referencia apropiada⁹⁻¹².

Después de la inoculación, mantener los recipientes protegidos de la luz y colocados en un sistema adecuado que proporcione una atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono. Incubar a 35 ± 2 °C.

Los medios de agar inclinados y los que se encuentran en frascos, deben inocularse en un plano horizontal hasta que se absorba el inóculo. Los tubos y frascos deben tener las tapas de rosca flojas durante las primeras tres semanas, para permitir la circulación de dióxido de carbono para el inicio del crecimiento. Posteriormente, para evitar la deshidratación, ajustar las tapas; aflojarlas brevemente una vez a la semana. Mantener los tubos en posición vertical si no se dispone de espacio suficiente.

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 de 40 a 42 °C⁹. Incubar un cultivo duplicado a 35 – 37 °C.

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.

X RESULTADOS

Se debe efectuar 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.

Registrar las observaciones⁹:

1. Número de días requeridos para que las colonias puedan ser visibles macroscópicamente. Los organismos de crecimiento rápido forman colonias maduras dentro de los 7 días; los organismos de crecimiento más lento requieren más de 7 días para presentar colonias maduras.
2. Número de colonias (frascos):
 - 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 definitivas.

Los frascos pueden examinarse invirtiéndolos sobre la platina de un microscopio de disección. Efectuar la lectura a 10 – 60x con luz transmitida. Explorar rápidamente a una velocidad de 10 – 20x en busca de colonias. Un aumento mayor (30 – 60x) es útil para observar la morfología de las colonias, es decir, forma espiral semejante a una cuerda.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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 procedimientos recomendados⁹⁻¹².

XII CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de recipientes de Middlebrook and Cohn 7H10 Agar se someten a prueba para determinar sus características de rendimiento. Mediante un asa calibrada de 0,01 mL se inoculan por extensión muestras representativas del lote con cultivos diluidos para contener 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) por mL de *Mycobacterium kansasii* grupo I (ATCC 21478), *M. scrofulaceum* grupo II (ATCC 19981), *M. intracellulare* grupo III (ATCC 13950), *M. fortuitum* grupo IV (ATCC 6841) y *M. tuberculosis* (ATCC 25177). Después de la inoculación, los recipientes se incuban con las tapas flojas a 35 ± 2 °C en una atmósfera suplementada con dióxido de carbono al 5 – 10%. Se efectúa la lectura de los recipientes para detectar crecimiento y pigmentación después de 7, 14 y 21 días de incubación. Todos los organismos presentan crecimiento de moderado a denso dentro de los 21 días. La pigmentación de las colonias es la siguiente: *M. kansasii* es blanca a amarillo crema; *M. scrofulaceum* es de amarillo medio a anaranjado; *M. tuberculosis*, *M. intracellulare* y *M. fortuitum* tienen un color crema.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
220958	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, pqt. de 10 tubos de tamaño A
220959	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, caja de 100 tubos de tamaño A
297448	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, pqt. de 10 tubos de tamaño C
297396	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, caja de 100 tubos de tamaño C
297274	BD BBL Middlebrook and Cohn 7H10 Agar Slants, frascos de 30 mL, caja de 100

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, and W.B. Dye, W.B. Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand.* 38:66-81.
4. Kubica, G.P., and W.E. Dye. 1967. Laboratory methods for clinical and public health mycobacteriology. PHS Publication No. 1547. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
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. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Cernoch, P.L., R.L. Enns, M.A. Saubolle, 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.
11. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
12. 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. Tenoer, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. 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