



PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD (Opcionales)

I INTRODUCCION

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol (caldo Middlebrook 7H9 con glicerol) es un medio de cultivo no selectivo para el cultivo de micobacterias.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

A. Procedimiento de preparación de inóculos

1. Inocular medios inclinados de Lowenstein-Jensen con cultivos de referencia de las cepas micobacterianas correspondientes mediante bastoncillos de inoculación estériles.
2. Incubar los tubos con las tapas flojas en atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono (5-10%) a 35 ± 2 °C hasta obtener un crecimiento denso (por lo general, dentro de las 2 – 3 semanas).
3. Obtener el crecimiento con un aplicador afilado estéril, extrayendo las células de la superficie del medio con cuidado de no incluir el medio de cultivo con la muestra de células.

a. Para *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177:

- (1) Transferir el crecimiento a 5,0 mL de Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol en un tubo de vidrio estéril con tapa a rosca y microesferas de vidrio estériles.
- (2) Agitar bien en vórtex (varios minutos) hasta que la suspensión no presente grumos grandes.
- (3) Comparar esta suspensión con el patrón de nefelómetro N° 1 de McFarland. La suspensión debe ser más turbia que el patrón.
- (4) Colocar el tubo en una gradilla durante 2 – 3 h a temperatura ambiente para permitir la precipitación de las partículas grandes al fondo.
- (5) Transferir el sobrenadante a un recipiente estéril.
- (6) Ajustar la turbidez de la suspensión al patrón N° 1 de McFarland (10^8 UFC/mL), añadiendo lentamente Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol estéril. Agitar bien.
- (7) Diluir a una concentración de 10^5 UFC/mL antes de su utilización. Mezclar bien e inocular el inóculo en 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 centrífugo estéril de 50 mL con tapa roscada con 8 – 12 microesferas de vidrio estériles (de 2 mm de diámetro) y 5 mL de diluyente para *Mycobacterium*, preparado de la manera siguiente:
 - Mezclar los elementos siguientes en un frasco de 1 L y ajustar el pH, con hidróxido sódico 1N a 6,7 – 7,0.

Albúmina bovina (sin ácido graso)	1,0 g
Polisorbato 80	0,1 mL
Agua purificada	500 mL
 - Esterilizar mediante filtración de membrana (filtro de 0,2 μ)
 - Dosificar asépticamente en alícuotas de 5,5 mL en tubos centrífugos estériles con tapas roscadas.
- (2) Emulsionar el crecimiento micobacteriano en la pared lateral de un tubo centrífugo con tapa roscada mediante un aplicador. Mezclar el crecimiento con el diluyente.
- (3) Tapar el tubo y agitar en vórtex aproximadamente 10 min hasta que se produzca la suspensión del crecimiento y se eliminen los grumos grandes.
- (4) Añadir 15 mL de diluyente para *Mycobacterium* estéril y mezclar bien.
- (5) Comparar esta suspensión con el patrón de nefelómetro N° 1 de McFarland. La suspensión debe ser más turbia que el patrón.
- (6) Colocar el tubo en una gradilla durante 2 – 3 h a temperatura ambiente para permitir la precipitación de las partículas grandes hasta el fondo.

- (7) Aspirar el sobrenadante y transferirlo a un recipiente estéril. La suspensión debe estar más turbia que el patrón N° 1 de McFarland y libre de partículas grandes. Si todavía se pueden observar partículas grandes, mezclar y dejar reposar durante 1 h más. Transferir el sobrenadante a un recipiente estéril.
- (8) Ajustar la turbidez de la suspensión a un patrón N° 1 de McFarland (10^8 UFC/mL), añadiendo lentamente diluyente micobacteriano estéril. Agitar bien.
- (9) Dosificar alícuotas de la suspensión en frascos para congelador, etiquetados con la identificación del organismo y la fecha de preparación.
- (10) Congelar las suspensiones colocando los frascos en un congelador de baja temperatura a -60 °C. Los frascos pueden conservarse durante un máximo de 6 meses.
- (11) Para su utilización, retirar el frasco congelado del congelador y descongelar rápidamente el contenido colocando el tubo en baño María de $30 - 35$ °C. Diluir a una concentración de 10^5 UFC/mL antes de su utilización. Mezclar bien e inocular el inóculo en 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. Con asas calibradas de 0,01 mL estériles desechables, inocular los tubos con cultivos preparados según descripción anterior.
 - b. Incubar los tubos con las tapas flojas a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.
2. Examinar los tubos después de 7, 14 y, si fuese necesario, 21 días, para determinar el crecimiento y la pigmentación.
3. Resultados previstos

Organismos de control de CLSI

**Mycobacterium tuberculosis* Crecimiento
H37Ra ATCC 25177

**Mycobacterium kansasii*, Crecimiento
grupo I ATCC 12478

**Mycobacterium scrofulaceum*, Crecimiento
grupo II ATCC 19981

**Mycobacterium intracellulare*, Crecimiento
grupo III ATCC 13950

**Mycobacterium fortuitum*, Crecimiento
grupo IV ATCC 6841

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

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar los tubos como se describe en la sección "Deterioro del producto".
2. Examinar a simple vista tubos representativos para cerciorarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
3. Incubar en atmósfera aerobia tubos representativos no inoculados a una temperatura de 20 a 25 °C y de 30 a 35 °C y examinar después de 7 días de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol es un medio suplementado que favorece el crecimiento de micobacterias, incluida la *M. tuberculosis*. Se utiliza principalmente para el crecimiento de cultivos puros de micobacterias para su utilización en estudios de laboratorio.

V RESUMEN Y EXPLICACION

Middlebrook y colegas desarrollaron la fórmula base del caldo 7H9 durante el mismo período en que diseñaron la base de agar 7H10¹⁻³. Ambos tipos de medios favorecen el crecimiento de las especies micobacterianas, cuando son suplementadas con nutrientes tales como glicerol, ácido oleico, albúmina y dextrosa, excepto para *M. bovis* que es inhibida por el glicerol.

Este medio se utiliza para preparar inóculos para análisis antimicrobianos, como medio base para pruebas bioquímicas y para subcultivo de cepas de referencia.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El gran número de sales inorgánicas de este medio proporcionan las sustancias esenciales para el crecimiento de micobacterias. El citrato sódico, al convertirse en ácido cítrico, ayuda a mantener algunos cationes inorgánicos en la solución. El cloruro sódico, la albúmina bovina, la dextrosa y la catalasa son componentes del enriquecimiento Middlebrook ADC. La albúmina bovina actúa como agente protector, al fijar los ácidos grasos libres, que pueden ser tóxicos para la especie *Mycobacterium*. La catalasa destruye los peróxidos tóxicos que pueden estar presentes en el medio. La dextrosa es una fuente de energía.

El cloruro sódico aporta electrolitos esenciales. El suplemento de glicerol favorece el crecimiento de las micobacterias.

VII REACTIVOS

Middlebrook 7H9 Broth

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Fosfato monopotásico	2,0	g
Fosfato disódico	1,5	g
Glutamato monosódico	0,5	g
Citrato sódico	0,1	g
Sulfato de amonio	0,5	g
Piridoxina	0,001	g
Citrato férrico de amonio	0,04	g
Sulfato magnésico	0,05	g
Sulfato de zinc	0,001	g
Sulfato de cobre	0,001	g
Biotina	0,5	mg
Cloruro de calcio	0,5	mg

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

El medio completo en tubos preparados contiene, por litro, además de los elementos anteriores, 2 mL de glicerol y los componentes de enriquecimiento ADC, a saber:

Cloruro sódico	0,85	g
Albúmina bovina (fracción V)	5,0	g
Dextrosa	2,0	g
Catalasa	4,0	mg
Piruvato sódico	1,0	g

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los tubos con tapas ajustadas deben abrirse con cuidado para evitar lesiones por la rotura del vidrio.

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 especiales⁴.

E emplear una técnica aséptica y seguir las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todo el proceso. Después de su utilización, los recipientes para muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Instrucciones para el almacenamiento

En el momento de recibir los tubos, guardarlos en un lugar oscuro a una temperatura de 2–8 °C. Evitar la congelación y el sobrecalentamiento. 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 periodos 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 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^{5,6}. Las muestras deben obtenerse antes de administrar los agentes antimicrobianos. Deben tomarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado

Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol

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.

Después de la inoculación, colocar los tubos en un sistema adecuado que proporcione una atmósfera aerobia enriquecida con 5-10% de dióxido de carbono. Incubar a 35 ± 2 °C durante un máximo de 8 semanas. Mantener flojas las tapas de los tubos durante las primeras 3 semanas, para permitir la circulación del dióxido de carbono para favorecer el crecimiento. Posteriormente, ajustar las tapas para evitar la deshidratación; aflojarlas brevemente una vez por semana.

Control de calidad del usuario

Véase "Procedimientos de control de calidad".

Cada lote de medios se ha probado con los microorganismos de control de calidad adecuados mediante una prueba que cumple las especificaciones del producto y los criterios aplicables del CLSI. Como siempre, las pruebas de control de calidad se deben llevar a cabo conforme a la normativa local, estatal, federal o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y/o a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio.

X RESULTADOS

Debe efectuarse la lectura de los cultivos a los 5 – 7 días después de la inoculación y una vez por semana después, durante un máximo de 8 semanas. El crecimiento micobacteriano de los tubos de caldo puede utilizarse para realizar pruebas adicionales de laboratorio, en caso necesario.

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 recomendados⁵⁻⁷.

XII CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol se analizan para determinar sus características de rendimiento. Con un asa calibrada de 0,01 mL, se inoculan muestras representativas del lote con cultivos diluidos a una concentración de 10^3 UFC (unidades formadoras de colonias) por cada 0,01 mL de *Mycobacterium kansasii* grupo I (ATCC 12478), *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 tubos se incuban con las tapas flojas a 35 ± 2 °C en una atmósfera suplementada con 5 – 10% de dióxido

de carbono. Se efectúa la lectura de los tubos para determinar el crecimiento después de 7, 14 y 21 días de incubación. Todos los organismos muestran crecimiento de moderado a denso dentro de los 21 días.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat. Descripción

221832 **BD BBL Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol, 5 mL**

XIV REFERENCIAS

1. Middlebrook, G. 1955. Fitzsimmons Army Hospital Report No. 1, Denver.
2. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am. J. Public Health. 48:844-853.
3. Middlebrook, G., M.L. Cohn, and W.B. Schaefer. 1954. Studies on isoniazid and tubercle bacilli. III. The isolation, drug-susceptibility and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients. Am. Rev. Tuberc. 70:852-872.
4. U.S. Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, 4th ed. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

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