

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

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

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

A. Procedimiento para la preparación de inóculos

1. Inocular agares inclinados del medio Lowenstein-Jensen con cultivos 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 grandes.
 - (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 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 centrífugo 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 – 7,0.

Albumina 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 asepticamente dosis de 5,5 mL en tubos estériles con tapa a rosca.
 - (2) Emulsionar el crecimiento micobacteriano en la pared lateral del tubo centrífugo 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. Transferir el sobrenadante a un recipiente estéril.
 - (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 tubo en un baño María de 30 – 35 °C. 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. Procedimiento de análisis del medio

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Con un asa calibrada de 0,01 mL desechable estéril, inocular en los recipientes de prueba cultivos preparados como se describe anteriormente.
 - b. Incubar los recipientes con las tapas flojas a 35 ± 2 °C en atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.
 - c. Incluir recipientes 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

Microorganismos	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

Seven H11 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. Los primeros medios fueron fórmulas a base de huevo, e incluían los medios Lowenstein-Jensen Medium y Petragnani. Dubos y Middlebrook contribuyeron decisivamente al desarrollo de diversas fórmulas que contenían ácido oleico y albúmina 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}.

Cohn et al modificaron la fórmula del agar 7H10 añadiendo un gramo de digerido pancreático de caseína por litro para favorecer el crecimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que presentaban un crecimiento escaso (o nulo) en 7H10 y otros medios de aislamiento convencionales⁴. Esta fórmula se ha denominado agar Seven H11.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Seven H11 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 digerido pancreático de caseína es una fuente abundante de nitrógeno para el crecimiento de bacilos tuberculosos y suministra algunos 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 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 inhibición parcial de bacterias se logra mediante la presencia del colorante verde malaquita.

VII REACTIVOS

Seven H11 Agar

Fórmula aproximada* por 900 mL de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	1,0	g
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
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

El medio completo en tubos preparados, además de los elementos enumerados anteriormente, contiene, por litro, 5 mL de glicerol y los componentes del medio de enriquecimiento Middlebrook OADC, a saber:

Cloruro sódico	0,85	g
Dextrosa	2,0	g
Albumina bovina (Fracción V)	5,0	g
Catalasa	3,0	mg
Ácido oleico	0,06	mL

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

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.

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 utilización, los tubos preparados, los recipientes de muestras 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 especiales².

Instrucciones para el almacenamiento: Al recibir los tubos, almacenarlos en un lugar oscuro a 2 – 8 °C. No congelar ni sobrealestar. No abrir hasta que se vayan a utilizar. 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 correspondientes⁹⁻¹². 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: Seven H11 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 micobacterias⁹. 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 a 35 ± 2 °C.

Los medios de agar inclinados deben inocularse en un plano horizontal hasta que se absorba el inóculo. Los tubos 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 verse a simple vista. 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. 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.

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 recomendados¹⁰⁻¹².

XII CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

Cohn et al. realizaron un estudio en el que se comparó Seven H11 Agar con el agar 7H10. De los 96 aislados clínicos de *M. tuberculosis* analizados, 13 no produjeron crecimiento en el medio 7H10 en las primeras tres semanas. 10 de los 13 cultivos crecieron en Seven H11 Agar a las tres semanas; los otros 3 requirieron una incubación de tres semanas más para la producción de crecimiento visible⁴.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
221391	BD BBL Seven H11 Agar Slants, pqt. de 10 tubos de tamaño A
221392	BD BBL Seven H11 Agar Slants, caja de 100 tubos de tamaño A
296105	BD BBL Seven H11 Agar Slants, pqt. de 10 tubos de tamaño C
297704	BD BBL Seven H11 Agar Slants, caja de 100 tubos de tamaño C

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. Public 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. 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.K. 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. Sahn, 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