BD Middlebrook 7H10 Agar

USO PREVISTO

BD Middlebrook 7H10 Agar (agar Middlebrook 7H10 BD) se utiliza para el aislamiento y cultivo de micobacterias.

PRINCIPIOS Y EXPLICACION DEL PROCEDIMIENTO

Método microbiológico.

El número de medios de cultivo de micobacterias ha aumentado mucho durante este siglo. Los primeros medios fueron fórmulas a base de huevo, e incluían los medios Löwenstein-Jensen 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 tóxicos[1]. 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 micobacterias[4].

BD Middlebrook 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. 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 contaminantes se logra mediante la presencia del colorante verde malaquita.

REACTIVOS

BD Middlebrook 7H10 Agar

Fórmula* por litro de agua purificada

Sulfato magnésico	0,025 g	Albúmina bovina (fracción V)	5,0 g
Citrato férrico de amonio	0,04	Catalasa	0,004
Citrato sódico	0,4	Piridoxina	0,001
Sulfato de amonio	0,5	Sulfato de zinc	0,001
Glutamato monosódico	0,5	Sulfato de cobre	0,001
Fosfato disódico	1,5	Biotina	0,0005
Fosfato monopotásico	1,5	Cloruro de calcio	0,0005
Agar	17,0	Verde malaquita	0,00025
Cloruro sódico	0,85	Glicerol	5,0
Glucosa	2,0	Acido oléico	0,05 mL

pH 6,6 ± 0,2

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

PRECAUCIONES

IVD . Solamente para uso profesional.

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

Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y desecho del producto usado en el documento **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO**.

Los procedimientos de laboratorio que implican la manipulación de micobacterias requieren de equipos y técnicas especiales para minimizar los riesgos biológicos[5-7]. Se requieren medidas de seguridad biológica de nivel 3 para la manipulación de muestras y cultivos.

ALMACENAMIENTO Y VIDA UTIL

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C, envueltas en su envase original, hasta justo antes de usarlas. Evitar la congelación y el calentamiento excesivo. Las placas pueden inocularse hasta su fecha de caducidad (ver la etiqueta en el paquete) e incubarse durante los períodos de incubación recomendados.
Las placas de grupos de 10 placas ya abiertos pueden usarse durante una semana siempre que se almacenen en un lugar limpio a una temperatura entre 2 y 8 °C.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Inocular muestras representativas con las cepas siguientes (para obtener los detalles, véase el documento **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO**). Incubar a una temperatura de 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia o en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.

Cepa	**Incubación**	**Resultado**
Mycobacterium tuberculosis H37Ra ATCC 25177	2 a 3 semanas	Crecimiento de bueno a excelente
Mycobacterium fortuitum DSM 46621	2 a 3 semanas	Crecimiento de bueno a excelente
Mycobacterium smegmatis DSM 43061	2 a 5 días	Crecimiento de bueno a excelente
Mycobacterium terrae ATCC 15755	2 a 3 semanas	Crecimiento de regular a excelente
Staphylococcus aureus ATCC 25923	2 a 5 días	Inhibido
Escherichia coli ATCC 25922	2 a 5 días	Inhibido
Sin inocular	Ambar, tono verdoso muy leve	

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

BD Middlebrook 7H10 Agar (placas **Stacker** de 90 mm). Controladas microbiológicamente.

Materiales no suministrados

Medios de cultivo auxiliar, reactivos y el equipo de laboratorio que se requiera.

Tipos de muestras

Este medio se utiliza para el aislamiento y cultivo de micobacterias a partir de muestras clínicas y también puede utilizarse para el cultivo de micobacterias en pruebas especiales (por ejemplo, para analizar desinfectantes contra micobacterias).
Consultar en las referencias los detalles acerca de las muestras adecuadas[6-10].

Procedimiento de análisis

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. Se recomienda la solución de N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH) como agente descontaminante y digestivo suave pero eficaz. Consultar en las referencias las instrucciones detalladas acerca de los métodos de descontaminación y cultivo[4-10].
Después de la inoculación, mantener las placas protegidas de la luz y colocarlas, con el lado del medio hacia abajo, en un frasco **BD GasPak** con un sobre de generación de dióxido de carbono desechable **GasPak** o cualquier otro sistema adecuado que proporcione una atmósfera aerobia enriquecida con dióxido de carbono. Incubar a 35 ± 2 °C. Evitar la deshidratación del medio durante la incubación.
Nota: Los cultivos de lesiones cutáneas presuntivas de *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. haemophilum, M. chelonae,* u otras especies con una temperatura óptima más baja deben incubarse a 25 – 33 °C. Incubar un cultivo duplicado a 35 – 37 °C[5,9].

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. Consultar en las referencias los detalles acerca de la morfología y la pigmentación de colonias[6-10].
Para efectuar la lectura de las placas, invertirlas en la platina de un microscopio de disección. Efectuar la lectura con un aumento de 10 – 60x con luz transmitida. Explorar rápidamente con un aumento de 10 – 20x para determinar la presencia de colonias. Es útil emplear un aumento mayor (30 – 60x) para observar la morfología de las colonias, es decir, las colonias espiraladas como cuerdas.
Registrar las siguientes observaciones[5,6]:
1. Número de días requeridos para que las colonias puedan ser visibles macroscópicamente.
2. Número de colonias:
   Sin colonias = Negativo
   Menos de 50 colonias = Registrar el recuento real
   50 a 100 colonias = 1+
   100 a 200 colonias = 2+
   Casi confluente (200 a 500) = 3+
   Confluente (más de 500) = 4+
3. Producción de pigmentación
   Color blanco, crema o beige = No cromógena (NC)
   Color limón, amarillo, anaranjado, rojo = Cromógena (Ch)

Los frotis con tinción pueden mostrar bacilos acidorresistentes, que se reseñan solamente como “bacilos acidorresistentes”, a menos que se realicen pruebas definitivas. Consultar en las referencias apropiadas la información acerca de las pruebas de diferenciación adicionales y los procedimientos para lograr una completa identificación de los organismos aislados[4-10].

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

BD Middlebrook 7H10 Agar es uno de los medios de agar estándar para el aislamiento y cultivo de micobacterias a partir de muestras clínicas[4,6,7-11].
Dado que este medio sólo es parcialmente selectivo, pueden crecer bacterias diferentes de las micobacterias si las muestras no son descontaminadas previamente de la manera adecuada[6,7,9,10].

Los cultivos negativos no eliminan la posibilidad de una infección activa de micobacterias. Una buena práctica de laboratorio consiste en inocular varias fórmulas de medios diferentes (sólidos y líquidos)[6-10].

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. 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. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
6. Sommers, H.M., and J.K. McClatchy. 1983. Cumitech 16, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., J.A. Morello. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Küchler, R., et al. 1998. Tuberkulose - Mycobacteriose. *In:* Mauch, H., R. Lüttiken, and S. Gatermann (ed.). MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, vol. 5. Urban & Fischer, Munich, Germany.
8. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.

9. Pfyffer, G.E., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: general charcteristics, isolation, and staining procedures. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. DIN 58943. 1996. Diagnosis of tuberculosis. Part 3: Detection of mycobacteria by culture methods. Beuth Verlag, Berlin.
11. Vincent, V., B.A. Brown-Elliott, K.C. Jost, Jr., and R.J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: phenotypic and genotypic identification. *In:* Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Yolken (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

ENVASE Y DISPONIBILIDAD

BD Middlebrook 7H10 Agar

Nº de cat. 254520	Medios en placa listos para usar, 20 placas
Nº de cat. 254521	Medios en placa listos para usar, 120 placas

INFORMACIÓN ADICIONAL

Para obtener más información, diríjase a su representante local de BD.

Becton Dickinson GmbH
Tullastrasse 8 – 12
D-69126 Heidelberg/Germany
Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16
Reception_Germany@europe.bd.com

http://www.bd.com
http://www.bd.com/europe/regulatory/

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection
BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2012 BD