

STONEBRINK ACIDIFICADO Y ENRIQUECIDO MEDIO

REF B0521821

IVD

→ USO

Cultivo y aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* variedad bovis, según técnica de Borda Bossana de Texidor, Domenech de Kwint y cols.

FUNDAMENTO

El método estandarizado para cultivar el *Mycobacterium tuberculosis* y otras micobacterias responsables de Tuberculosis resulta complicado y riesgoso (por la centrifugación) para su práctica en servicios generales y laboratorios privados.

Por ello presentamos un método de cultivo sencillo y económico, desarrollado por Borda Bossana de Texidor D. y cols, que cubre todas las exigencias para un correcto diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis, facilitando la realización de cultivo a todo nivel del área salud, pues permite identificar la micobacteria involucrada y efectuar las pruebas de sensibilidad a los quimioterápicos antibacilares, precisando el tratamiento para lograr un control verdaderamente eficaz de la Tuberculosis.

Características y ventajas del método

- Utilización de un solo tubo de ensayo para decontaminar y concentrar la muestra.
- Decontaminación de la muestra con NaOH 4 % y concentración mediante la precipitación con solución de CaCl₂ y BaCl₂. No es necesario el uso de centrífuga.
- Al utilizar medios de cultivo acidificados se evita la neutralización de los lavados.
- Incremento del crecimiento de los gérmenes debido al enriquecimiento de los medios.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0521821: x 3 tubos

FÓRMULA

FOSFATO MONOPOTÁSICO	20,0 g
FOSFATO DISÓDICO	2,0 g
PIRUVATO DE SODIO	6,25 g
EXTRACTO DE LEVADURA	7,5 g
HIDROLISADO ÁCIDO DE CASEÍNA	1,5 g
AGUA PURIFICADA	500 ml
HUEVOS FRESCOS ENTEROS	1000 ml
VERDE DE MALAQUITA 2%	15,0 ml
PH FINAL: 6,4 ± 0,2	

INSTRUCCIONES

Medio de cultivo listo para usar.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo color verde pálido, opaco.

ALMACENAMIENTO

A 2-8 °C, en la oscuridad.

PROCEDIMIENTO

Indicaciones sobre la recolección y el tratamiento de las muestras:

Realizar un estudio seriado con tres cultivos por cada paciente para aumentar la posibilidad de aislar al germen. En caso de tratarse de una micobacteria diferente al *Mycobacterium tuberculosis*, el estudio seriado permite contar con suficientes aislamientos para considerar a dicha micobacteria como responsable de la enfermedad.

La muestra a analizar tiene que ser representativa, de "calidad y cantidad", es decir, provenir de la lesión a estudiar y en cantidad suficiente.

Mediante técnica aséptica, recolectar la muestra en recipiente estéril perfectamente rotulado y conservarla refrigerada hasta su envío al laboratorio.

Espuito: recolectar en un frasco estéril todas las expectoraciones obtenidas durante 12 horas. Procesar la muestra siguiendo la metodología descripta.

Hisopado laríngeo: recolectar la muestra mediante el uso de hisopos estériles y procesarla siguiendo la metodología descripta. En la etapa de la decontaminación y concentración, introducir el hisopo conteniendo la muestra en el tubo estéril que contiene partes iguales de NaOH 4% y agua destilada estéril, presionando contra las paredes del tubo para desprender el material adherido al hisopo. Extraer el hisopo y continuar con la metodología descripta.

Lavado gástrico, lavado bronquial, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, pericardio, líquido sinovial y pus: proceder como indica la metodología descripta. En el caso de líquido cefalorraquídeo se aconseja sembrar un tubo de medio de cultivo de cada muestra directamente sin decontaminar.

Orina: recolectar por separado en frascos estériles la última orina nocturna y la primera orina de la mañana. En el laboratorio mezclar ambas muestras y precipitar con 1 a 2 ml de solución de CaCl₂ y BaCl₂. Dejar reposar en la heladera durante 24 horas. Extraer 5 ml del precipitado del fondo del tubo y proceder como indica la técnica de cultivo excepto que no se debe agregar la solución precipitante de CaCl₂ y BaCl₂.

Piezas quirúrgicas, biopsias, ganglios: triturar las muestras en mortero con 2 ml de agua destilada estéril y una pequeña cantidad de

arena estéril. Con la papilla así obtenida, proceder como indica la metodología.

Primeramente, realizar el examen microscópico directo de la muestra y posterior coloración de Ziehl-Neelsen. No aconsejamos realizar el examen directo a las muestras de orina y de lavado gástrico.

Metodología Técnica de cultivo

Decontaminación y concentración de la muestra en estudio

- En un tubo estéril de 16 x 150 mm aproximadamente, con tapón de goma estéril y rotulado, agregar 5 ml de NaOH 4%, igual cantidad de la muestra en estudio y 5 gotas de solución precipitante de CaCl₂ y BaCl₂
- Tapar y agitar fuertemente durante 20 segundos aproximadamente.
- Incubar en estufa a 33-37 °C. A los 5 y 10 minutos de incubación agitar el tubo durante 20 segundos aproximadamente. Volver a incubar a 33-37 °C durante 50 minutos (tiempo total de incubación: 1 hora).
- Retirar de la estufa el tubo conteniendo la muestra decontaminada y concentrada.

Siembra

- Rotular los tubos de medio Stonebrink Acidificado y Enriquecido que se utilizarán para sembrar la muestra con los siguientes datos: nombre del paciente, fecha y número de entrada del laboratorio.
- Extraer del fondo del tubo utilizado para decontaminar y precipitar la muestra, 2 ml del precipitado formado e inocular 0,5 ml del precipitado en cada tubo de medio Stonebrink Acidificado y Enriquecido. Rotar los tubos para lograr una distribución homogénea de la muestra.

Incubación

En aerobiosis, a 33-37°C.

Observar los cultivos dos veces por semana y registrar el tiempo de aparición de las colonias. Si no se observa desarrollo de colonias, incubar hasta 8 semanas.

Importante: incubar los tubos de medio Stonebrink Acidificado y Enriquecido con las tapas a rosca flojas, inclinados 5° aproximadamente. Esta posición evita que el inóculo contacte con la parte superior del tubo.

Controlar a las 72 horas los tubos sembrados. Si el inóculo ha sido absorbido, ajustar las tapas y agrupar los tubos con igual identificación. Si aún están húmedos, incubar hasta que se sequen y luego ajustar las tapas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Observar las características morfológicas y la presencia o ausencia de pigmento en las colonias. Tener en cuenta el tiempo que ha transcurrido desde la inoculación hasta la observación de crecimiento.

Los cultivos positivos generalmente se observan entre los 13 y 28 días de incubación, dependiendo del contenido de bacilos en las

muestras sembradas, mientras que el 3% de las micobacterias suele crecer a los 40 días de incubación.

La aparición de colonias color crema, rugosas o cremosas, amarillentas es indicio de cultivo positivo, el cual será confirmado realizando la coloración de Ziehl-Neelsen a un extendido del mismo para determinar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

De la misma manera se procederá para los cultivos contaminados y cultivos negativos (cuando no se observen colonias).

La intensidad de positividad se informará según las normas latinoamericanas:

- Colonias confluentes: positivo (+++).
 - Colonias separadas: positivo (++)
 - De 20 a 100 colonias: positivo (+).
 - Menos de 20 colonias: positivo. Informar el recuento obtenido.
 - No se observan colonias: negativo.
 - Cultivo contaminado: desarrollo en la primera semana de incubación.
- Enviar los cultivos positivos a laboratorios de referencia para realizar la tipificación y las pruebas de sensibilidad a los quimioterápicos antibacilares.

CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS VARIEDAD BOVIS	SATISFACTORIO
CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
MEDIO SIN INOCULAR	SIN CAMBIOS

LIMITACIONES

- Considerar y reportar los resultados negativos luego de 8 semanas de incubación en aerobiosis, a 33-37 °C.
- El medio preparado es color verde pálido y puede tener áreas de partículas amarillas debido a los lípidos de la yema de huevo. No confundir esto con el crecimiento de microorganismos.
- Previo a la inoculación de la muestra, mantener los tubos bien cerrados para evitar la contaminación y desecación del medio de cultivo. También porque la presencia de un ambiente húmedo es necesario para el desarrollo de las micobacterias.
- Mantener el medio de cultivo al abrigo de la luz debido a que el verde de malaquita es fotosensible.
- Todas las muestras durante su recolección y/o extracción deben mantenerse al abrigo de la luz, refrigeradas, y ser remitidas lo más pronto posible al laboratorio. En caso de deshidratación, agregar agua purificada estéril y no solución fisiológica.
- En el proceso de decontaminación de la muestra, la concentración de NaOH tiene que disminuir al 2% (para evitar la destrucción de bacilos); de allí la necesidad de contar con partes iguales de la muestra a investigar y del NaOH.
- Si los tubos presentan agua de condensación, es necesario extraerla antes de efectuar la siembra.

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Trabajar en ambiente aislado y cerrado. Utilizar bandejas de acero inoxidable para su fácil desinfección con fenol al 5%, o alcohol y fuego directo.
- Utilizar guantes, barbijos, anteojos o máscara y ropa protectora cuando se manipula la muestra y el producto. Las propipetas o pipetas tienen que estar adaptadas con pera de caucho; las pipetas, sea cual fuere el dispositivo que se adapte deben tener colocado un algodón firme en el extremo superior. Utilizar todos los materiales intervinientes en la técnica esterilizados en autoclave preferentemente y pipetas en pipetero de metal.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

REFERENCIAS

- Nelles A. 1966. Methodes Simples de Traitement Preliminaire des Echantillons. Bull. Int. Un. Tuber., 38: 72.
- Cetrángolo Abel. 1971. Diagnostico Bacteriológico de la Tuberculosis. Reseñas de Diagnóstico, Publicación Lepetit, 4: N° 8.
- Manual de Bacteriología de la Tuberculosis. Técnicas y Procedimientos Básicos. Washington D. C. OPS. (CD/TB/ST/LAB), 1973.
- Borda Bossana de Texidor D., Texidor C., Domenech de Kwint M. C., Volpe de Molina E. y Pasquinelli E. 1977. Nuevo Método Sencillo y Económico para Facilitar el Cultivo del Bacilo Tuberculoso, Rev. Argentina de Tuberculosis y Enfermedades Pulmonares, 38: 1834.
- Borda Bossana de Texidor, Texidor C., Smith de Marchesini I. y Domenech de Kwint M. C. 1979. Crecimiento Precoz del Bacilo Tuberculoso con nuestro Método Sencillo y Económico Incorporándole Enriquecedores, Actas del XVII Congreso Argentino de Tisiología y Neumonología. 687-691.
- Borda Bossana de Texidor D., Texidor C., Domenech de Kwint, M. C. y Barrera. 1982. Ampliación de Experiencias con Nuestro Método Sencillo y Económico para Cultivar al Bacilo Tuberculoso. Incorporación de Enriquecedores que Aceleran su Crecimiento, Bull. UICT. 57: N° 1. 58.
- Domenech de Kwint M. C., Borda Bossana de Texidor D., Texidor C., Gottlieb D. A. Técnica: Miraglia de Christin s. 1985. Técnica de Precipitación Previa al Cultivo del Bacilo de Koch en Orina. Presentación IV Congreso Argentino de Microbiología. Lib. de Res. C3.

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento. Conservar el producto según las indicaciones del rótulo. La presencia de burbujas en el medio de cultivo no altera la calidad ni el rendimiento del mismo, según los controles de calidad realizados.

AUTORIZACIÓN ANMAT

PM 1292-30
Dir. Técnico: Bioq. Alejandro Rossi

SIMBOLOS UTILIZADOS

IVD DIAGNÓSTICO IN VITRO	REF CÓDIGO N°	LOT LOTE N°	STERILE ESTERIL	
ELABORADOR	N° DE DETERMINACIONES	INSTRUCCIONES DE USO	FECHA DE VENCIMIENTO	LÍMITE DE TEMPERATURA