

STONEBRINK MEDIO

REF B0520921

IVD

→ USO

Cultivo y aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* variedad bovis.

FUNDAMENTO

Los nutrientes de este medio de cultivo constituyen un rico soporte para el crecimiento de *Mycobacterium bovis*. El verde de malaquita inhibe el desarrollo de la flora acompañante Gram positiva y de algunas bacterias Gram negativas.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0520921: x 3 tubos.

FÓRMULA

FOSFATO MONOSÓDICO	3.5 g
FOSFATO DISÓDICO	2.0 g
PIRUVATO DE SODIO	6.25 g
HUEVOS FRESCOS ENTEROS	1000 g
VERDE DE MALAQUITA 2%	15 ml
AGUA PURIFICADA	500 ml

La fórmula puede ser ajustada y/o suplementada para cumplir los criterios de desempeño y aceptación de producto, cumpliendo su uso previsto.

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.

Hisopado laríngeo: recolectar la muestra mediante el uso de hisopos estériles.

Lavado gástrico, lavado bronquial, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, pericardio, líquido sinovial y pus: recolectar en frasco estéril.

Orina: recolectar por separado en frascos estériles la última orina nocturna y la primera orina de la mañana. En el laboratorio mezclar ambas muestras. Dejar reposar en heladera durante 24 horas, luego centrifugar y analizar.

Piezas quirúrgicas, biopsias, ganglios: triturar las muestras en mortero con 2 ml de agua destilada estéril y una pequeña cantidad de arena estéril para obtener una papilla que será utilizada en la siembra.

Primeramente, realizar el exámen 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.

Se recomienda decontaminar la muestra antes de ser inoculada. Las técnicas de decontaminación dependerán de la muestra en estudio y son las siguientes:

Técnica de decontaminación:

Espuito: agregar igual volumen de NaOH 4% y agitar periódicamente durante 30 minutos a 37 °C. Luego transferir a un tubo de centrífuga y centrifugar durante 30 minutos a 3000 r.p.m. Volcar el sobrenadante sobre un recipiente que contenga desinfectante fenólico y utilizar el sedimento para efectuar nuevos extendidos, neutralización y posterior siembra.

Contenido gástrico, lavado bronquial y aspirado bronquial: centrifugar 30 minutos a 3000 r.p.m. Descartar el sobrenadante. Agregar al sedimento 3 ml de NaOH 4 % y luego proceder como se describió para el esputo.

Orina: sedimentar 24 horas en heladera. Descartar el sobrenadante. Centrifugar el sedimento a 3000 r.p.m. durante 30 minutos. Descartar el sobrenadante y llevar a 3 ml con solución fisiológica estéril. Agregar 3 ml de NaOH 4% y proceder de la misma manera que para el esputo.

Líquido pleural, líquido ascítico y líquido cefalorraquídeo: centrifugar la muestra y descartar el sobrenadante. Observar microscópicamente el sedimento; si no presenta gérmenes, no agregar NaOH 4% y sembrar en forma directa.

Biopsias: agregar 5 ml de agua destilada estéril y centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Decantar y centrifugar el sobrenadante a 3500 r.p.m. durante 30 minutos. Sembrar el sedimento en forma directa previa homogeneización.

Hisopado laríngeo: En la etapa de la decontaminación y concen-

tración, introducir el hisopo conteniendo la muestra en un 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.

Toda muestra decontaminada debe ser neutralizada previo a su siembra.

Se recomienda utilizar H₂SO₄ 5% en presencia del indicador rojo de fenol a pH neutro que origina color salmón. No es aconsejado el uso de HCl por la formación de cloruro de sodio que puede ser nocivo o tóxico para el bacilo de Koch.

Siembra

Inocular aproximadamente 0,5 ml por tubo sobre la superficie del medio de cultivo. Rotar los tubos para lograr una distribución homogénea de la muestra.

Generalmente se siembran dos tubos de Lowenstein Jensen y un tubo de Stonebrink Medio. Este último contiene piruvato de sodio y favorece el desarrollo de cepas disgénicas como bacilos isoniazida resistentes y sobre todo de Mycobacterium bovis que es causal de algunos casos de enfermedades humanas.

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, incubar hasta 8 semanas.

Importante: incubar los tubos con las tapas 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.
- 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, barbijo, 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.

En caso de utilizar centrifugas, deben tener sistemas de bioseguridad que impidan la diseminación de aerosoles.

-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. Tuberc., 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: 18 34.
- Borda Bossana de Texidor, Texidor C., Smith de Marchesini L. 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. UI CT. 57: N° 1. 58.
- Domenech de Kwint M. C., Borda Bossana de Texidor D., Texidor C., Gotlieb D. A. Técnica: Miraglia de Christin S. 1985. Técnica de Precipitación Previa al Cultivo el Bacilo de Koch en Orina. Presentación IV Congreso Argentino de Microbiología. Lib. de Res. C3.
- Mac Faddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification maintenance of medical bacteria, volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Forbes, Sahm and Weissfeld. 1998. In Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby,
- Isenberg (ed.). 1992. Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

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

Código B0520921

PM 1292-30

Dir. Técnico: Bioq. Alejandro Rossi

SÍMBOLOS UTILIZADOS

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