

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Manual de Instrucciones

Procesamiento y cultivo de muestras
para la identificación de
Mycobacterium tuberculosis
y *Mycobacterium bovis*

Dirección de Diagnósticos y Control Técnico (DILACOT)



Isabel N. de Kantor (PAHO/OPS)
Amelia Bernardelli (SENASA)



Este Manual de Instrucciones presenta la metodología que se debe seguir para el cultivo de muestras y la identificación de micobacterias utilizando el Equipo de Reactivos que se adjunta. Todas las operaciones se deben realizar frente a la llama del mechero, en cabina de aislamiento o campana de flujo laminar, con la adecuada técnica bacteriológica, cuidando de flamear los bordes de los tubos al abrirlos y antes de cerrarlos. Los reactivos deben ser previamente esterilizados en autoclave.

Equipo para el cultivo e identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*

El conjunto de reactivos provisto en el equipo permite aplicar un método básico para la identificación de estas micobacterias y su diferenciación en muestras de origen humano y animal.

Cada caja contiene:

- Veinte tubos a rosca con medio de Löwenstein-Jensen (Tubos N° 1)
- Veinte tubos a rosca con medio de Stonebrink (Tubos N° 2)
- Un frasco con indicador de pH rojo fenol (Reactivo N° 3)
- Un frasco con solución de Tween 80 al 10% (Reactivo N° 4)
- Un frasco con solución acuosa de nitrato de sodio al 0,085% (Reactivo N° 5)
- Un frasco con reactivo de Lampe polvo (Reactivo N° 6)
- Manual de instrucciones

Advertencia: Mantener el equipo refrigerado

*Solicitar el equipo a:
Dirección de Diagnóstico y Control Técnico (DILACOT) – SENASA
TE: 4836-1992
Av. Alexander Fleming 1653
(1640) Martínez – Pcia. de Buenos Aires
República Argentina*

1. Tratamiento de la muestra previo al cultivo

Colocar la porción seleccionada del material en un mortero de porcelana previamente esterilizado y envuelto en papel, de una capacidad tres o más veces mayor que el tamaño de la muestra. Agregar una cantidad pequeña de arena y de agua destilada estériles y trabajar la mezcla con la maza del mortero, cuidando de mantener a éste cubierto con el papel. Con una pipeta Pasteur provista de una propipeta de goma, trasvasar la suspensión a un tubo a rosca esterilizado. Para eliminar la flora asociada que se encuentra en la mayoría de las muestras, proceder a su decontaminación, según se describe a continuación:

1.1 Método de Petroff

Colocar en un tubo a rosca esterilizado aproximadamente 2 ml. de la suspensión anterior, agregar 4 ml. de solución estéril de hidróxido de sodio al 4% y mezclar vigorosamente. Dejar incubar a 37°C durante 20 minutos, agitando cada 5 minutos. Centrifugar a 2000-3000 revoluciones por minuto y desechar el sobrenadante. Agregar al sedimento 1 ó 2 gotas de solución de rojo fenol (Reactivo N° 3) y la cantidad necesaria de solución de ácido sulfúrico al 10%. (Para producir el viraje del indicador del rojo violáceo al amarillo son suficientes 1 ó 2 gotas). Lavar para eliminar los restos de ácido. Agregar 3 ml. de agua destilada estéril, agitar, centrifugar durante 10 minutos y desechar el sobrenadante. Adicionar 1 ó 2 ml. de agua destilada estéril.

2. Inoculación en los medios de cultivo

Inocular 4 ó 5 gotas de la suspensión anterior en dos tubos con medio de Löwenstein-Jensen (Tubos N° 1) y en dos tubos con medio de Stonebrink (Tubos N° 2). Cubrir con papel de aluminio un tubo con medio de Löwenstein-Jensen y otro con medio de Stonebrink. Ello permitirá reconocer las colonias pigmentadas que crecen en la oscuridad. Incubar a 37°C. Realizar observaciones cada 7 días para poder diferenciar los cultivos de desarrollo rápido de los de desarrollo lento.

Mantener los medios de cultivo en incubación hasta 60 días. Tomar nota del tiempo en que se desarrollan en los medios de Löwestein-Jensen y de Stonebrink. Un desarrollo mejor y más temprano en el último medio podría ser indicativo de la especie *Mycobacterium bovis*.

3. Observación microscópica

Realizar la coloración de Ziehl-Neelsen sobre las colonias aisladas. Colocar una gota de agua sobre un portaobjeto, tocar la colonia con un asa estéril y mezclar el material bacteriano con la gota de agua, fijar por calor y colorear.

Los bacilos ácido-alcohol resistentes aparecen como bastoncitos delgados y rojos, ligeramente curvos, más o menos granulosos, aislados, apareados o en grupos, destacándose claramente sobre el fondo azul.

4. Pruebas de identificación

4.1 Catalasa a 68°C

Mezclar partes iguales de la solución reguladora de Tween 80 al 10% (Reactivo N° 4) y agua oxigenada de 110 volúmenes (solución de peróxido de hidrógeno al 30%).

Colocar en un tubo 0.5 ml. de agua destilada, agregar el contenido de un asa cargada de colonias tomadas de un cultivo joven. Mantener el tubo en un baño de agua a 68°C durante 20 minutos. Retirar, dejar enfriar a temperatura ambiente y agregar 0.5 ml. de la mezcla de Tween 80 y agua oxigenada. No agitar. Observar la formación de burbujas en la superficie. Dejar transcurrir 20 minutos antes de informar el resultado. Como control negativo se emplea un tubo que contenga sólo el agua destilada, al cual se le agregan los reactivos.

4.2 Nitrato Reductasa

Colocar en un tubo 4 ó 5 gotas de agua destilada, introducir con un asa aproximadamente

10 mg. de masa bacilar y homogeneizar la mezcla. Agregar 2 ml. de la solución de nitrato de sodio que constituye el sustrato (Reactivo N° 5). Incubar a 37°C durante 2 horas. Al cabo de ese tiempo, agregar con una espátula una pequeña cantidad del Reactivo de Lampe (Reactivo N° 6).

La prueba no es cuantitativa; se considera positiva cuando aparece color rosa.

Como control negativo se emplea un tubo que contenga sólo el sustrato.



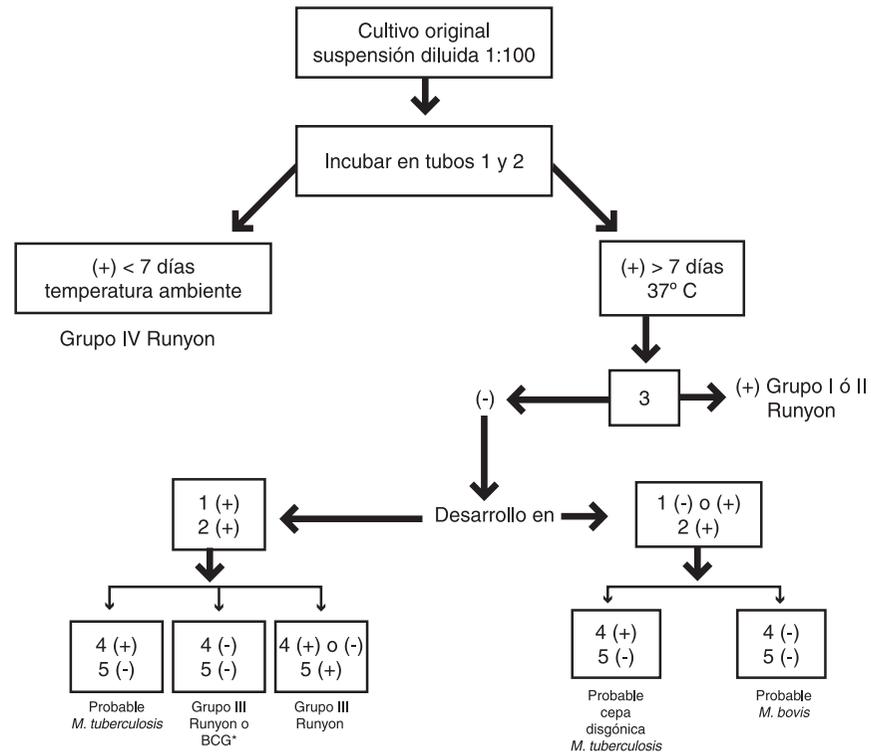
Diagrama 1: esquema de la utilidad de cada una de las técnicas antes descritas.
Por ejemplo:

- a) Un cultivo que se haya desarrollado sólo en el medio de Stonebrink a 37°C en más de 7 días, no pigmentado y que dé resultado negativo a las pruebas de nitrato reductasa y catalasa a 68°C probablemente es *Mycobacterium bovis*.
- b) Un cultivo positivo obtenido en un período de 7 días o menos, será identificado como perteneciente al grupo IV de Runyon (cepas saprófitas).
- c) Un cultivo que se haya desarrollado tanto en Löwenstein-Jensen como en Stonebrink a 37°C en más de 7 días, no pigmentado y que dé resultado positivo a la prueba de nitrato reductasa y negativo a la de catalasa a 68°C, es probable que sea *Mycobacterium tuberculosis*.

Para una tipificación más completa enviar al Laboratorio de Referencia.



Diagrama 1
Diagrama de diferenciación básica de micobacterias



1 Löwenstein - Jensen
2 Stonebrink
3 Pigmentación en oscuridad y/o luz

4 Nitrato reductasa
5 Catalasa 68° C
(* Muestras de lesiones postvacunales en niños)

Anexo

Medio de Löwestein-Jensen

Fosfato monopotásico anhidro ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) p.a.	2,4 g.
Sulfato de magnesio ($\text{SO}_4 \text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) p.a.	0,24 g.
Citrato de magnesio p.a.	0,6 g.
L-asparagina p.a.	3,6 g.
Glicerina p.a.	12,0 ml.
Agua destilada c.s.p.	600,0 ml.
Huevos enteros	1000,0 ml.
Solución verde de malaquita al 2% recién preparada (estéril)	20,0 ml.

Equipo necesario

Preparar y esterilizar:

- Un frasco fraccionador de 2 litros, provisto de tubo de goma o látex, pinza de Mohr y accesorio en forma de campana para verter. (Esterilizar a 120°C, 20 minutos).
- Un embudo grande con dos capas de gasa. Sujetar la gasa con tela adhesiva al borde del embudo para que no se mueva. Doblar un trozo de tela de algodón o lino sobre el embudo forrado con la gasa para protegerlo de la contaminación ambiental. Envolver en papel para esterilización. (Esterilizar a 120°C, 20 minutos).
- Probeta graduada de 1 litro. (Esterilizar a 120°C, 20 minutos).
- Frasco de licuadora o mezcladora con tapa. De no contar con ellos, preparar un matraz de 2 litros de capacidad, con trozos de vidrio en su interior a fin de homogeneizar los huevos por agitación manual. (Esterilizar a 120°C, 20 minutos).
- Tubos, preferiblemente con tapa a rosca, en cantidad suficiente. (Esterilizar a 120°C, 20 minutos).

Método de preparación

- Disolver las tres primeras sales y la asparagina en 200 ml. de agua destilada. Calentar a baño de María hasta disolución de la asparagina.
- Pasar a un frasco de 2000 ml. de capacidad, agregar la glicerina y el agua destilada hasta completar 600 ml.
- Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121°C y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Los huevos deben ser frescos, preferentemente de granja. Limpiarlos cuidadosamente con un cepillo, agua y jabón y dejarlos durante algunos minutos en un recipiente con agua jabonosa. Enjuagarlos cuidadosamente con agua corriente, colocarlos en un canastillo de alambre y limpiarlos con una gasa embebida en alcohol de 70°.
- Quebrar los huevos, uno por vez en el borde de una probeta estéril de un litro y volcar en ella su contenido. Trasvasarlos luego al vaso de la licuadora hasta completar un litro y mezclarlos con cuidado de no causar exceso de burbujas. Volcar los huevos ya homogeneizados en el matraz que contiene la solución de sales, asparagina y glicerina y agregar la solución de verde de malaquita.
- Filtrar por el embudo estéril forrado con gasa y recibir el filtrado en el frasco fraccionador, cuidando de cerrar con una pinza de Mohr el tubo de goma de salida.
- Distribuir el medio utilizando la campana y la pinza de Mohr. Trabajar en forma estéril y evitar la formación de burbujas.
- El medio se distribuye en cantidades de 9 ml. en tubos estériles de 20 x 125 mm. con tapa de rosca o de 7 ml. de tubos de 17 x 170 ó 18 x 180 mm.
- Coagular el medio colocando los tubos en posición inclinada en un horno termostático o en un coagulador especial a 80°C durante 40 minutos. Terminada la coagulación, dejar enfriar los tubos 30 minutos y luego incubar a 37°C durante 24-48 hs. para controlar su esterilidad y eliminar el agua de condensación excesiva.

Medio de Stonebrink

Fosfato mono potásico anhidro ($\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$) p.a.	3,5 g.
Fosfato disódico ($\text{PO}_4 \text{HNa}_2 2\text{H}_2\text{O}$) p.a.	2,0 g.
Piruvato de sodio p.a.	6,25 g.
Agua destilada	500,0 ml.
Huevos enteros (aproximadamente 2 docenas)	1000,0 ml.
Solución verde de malaquita al 2%, recién preparada (estéril)	40,0 ml.

Equipo necesario

El mismo que el descrito para la preparación del medio de Löwenstein-Jensen.

Métodos de preparación

A 200 ml. de agua destilada en un matraz de 1000ml. de capacidad, agregar los fosfatos y el piruvato de sodio. Mezclar hasta obtener la disolución completa. Llevar a 500 ml. con agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Los pasos siguientes de la preparación del medio y su fraccionamiento se efectúan en la forma descrita para el de Löwenstein-Jensen.

Coloración de Ziehl-Neelsen

Solución concentrada de fucsina básica saturada en alcohol

Alcohol etílico de 95°	100,0 ml.
Fucsina básica p.a.	3,0 g.

Solución de trabajo de fucsina básica

Fucsina básica solución saturada en alcohol	10,0 ml.
Fenol al 5% p.a.	90,0 ml.

Alcohol ácido

Acido clorhídrico (concentrado) p.a. 3,0 ml.

Alcohol etílico de 95° 97,0 ml.

Solución concentrada de azul de metileno

Azul de metileno p.a. 1,0 g.

Alcohol de 95° 100,0 ml.

Solución de trabajo de azul de metileno

Solución concentrada 10,0 ml.

Agua destilada 100,0 ml.

Dejar reposar 24 horas y filtrar

Procedimiento

1. Preparar el frotis, dejar secar a temperatura ambiente o con calor suave.
2. Fijar por calor, "cortando" la llama del mechero 2 ó 3 veces con el portaobjetos.
3. Agregar al frotis ya fijado fucsina de Ziehl, calentar el portaobjetos por debajo, hasta desprendimiento de vapores, sin prolongar este efecto. Dejar luego 3 minutos en contacto con la fucsina.
4. Enjuagar con agua destilada.
5. Decolorar con alcohol etílico de 95° que contenga 3% de ácido clorhídrico concentrado por volumen hasta que quede solamente una muy ligera coloración rosada (de 2 a 3 minutos).
6. Lavar con agua destilada.
7. Cubrir con la solución de azul de metileno durante 1 minuto.
8. Lavar con agua corriente y dejar secar a temperatura ambiente.
9. Observar al microscopio bajo objetivo de inmersión (100 x).

**Prueba de nitrato reductasa
reactivo**

Acido sulfanílico p.a. 1 parte

N (1 – naftil) etilendiamina, clorhidrato p.a. 1 parte

Acido L (+) tartárico p.a. 10 partes

Verter los reactivos en un frasco de color oscuro, agitar vigorosamente para mezclar antes de usar.

*Referencia: Kantor, Isabel N. de; Bernardelli, Amelia. **Identificación preliminar de micobacterias aisladas en muestras de origen humano o animal.** Rev.Med.Vet.(Bs As).Vol.68-N°2, 1987*





SENASA

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Av. Paseo Colón 367 (1063) Capital Federal

República Argentina

Teléfonos: 4331-6041 al 49

<http://www.senasa.gov.ar>

Dirección de Diagnósticos y Control Técnico - SENASA

Av. Sir Alexander Fleming 1653 (1640) Martínez, Buenos Aires

República Argentina

Teléfono: 4836-1992