

## MEDIO PARA EL AISLAMIENTO DE MYCOBACTERIA

**1- USO PREVISTO**

El agar Lowenstein-Jensen es un medio selectivo bien adaptado para el aislamiento, la enumeración y la diferenciación de mycobacteria.

Este medio puede usarse para:

- Cultivo primario y aislamiento a partir de muestras patológicas de *M. tuberculosis* y mycobacteria atípicas.
- Determinación de la sensibilidad de las mycobacteria a antibióticos específicos. Con este fin, el medio es impregnado en primer lugar con concentraciones crecientes de antibióticos (antes de la coagulación del medio por calentamiento a 85°C).
- Subcultivo y conservación de cepas bacilares.
- Pruebas bioquímicas y enzimáticas *in situ* para la diferenciación de los tipos de mycobacteria.

**2- PRINCIPIO**

La selectividad del medio se basa en la presencia de verde malaquita y sales minerales, que inhiben el crecimiento de la mayoría de los organismos contaminantes.

El crecimiento de las mycobacteria se promueve mediante los nutrientes suministrados, incluido el huevo y los elementos traza.

**3- CÓMO SE SUMINISTRA**

- Medio listo para usar:
  - 25 tubos inclinados con tapón de rosca, de 7 ml código 55244
- Medio deshidratado:
  - frasco de 500 g código 69675

**4- COMPOSICIÓN TEÓRICA (g/l de agua destilada)**

El agar Lowenstein-Jensen se elabora según la fórmula descrita por Lowenstein (1) y modificada por Jensen (2).

- Medio deshidratado:

Fosfato monopotásico	2,4
Sulfato magnésico	0,24
Citrato magnésico	0,6
Aspargina (anhidra)	3,6
Almidón de patata	30
Verde malaquita	0,4
- Medio listo para usar:

Base de medio deshidratado	
Suspensión de huevo	1000 ml

**Preparación del medio:**

Homogeneice el polvo contenido en el frasco.

- Añada **37,2 gramos** de medio deshidratado a 600 ml de agua destilada estéril fría con 12 ml de glicerol para bacteriología. No añada glicerol cuando prepare el agar de Lowenstein-Jensen sin glicerol.
- Mezcle hasta que se obtenga una suspensión homogénea. Caliente suavemente, agitando constantemente y luego caliente hasta hervir durante 1 a 2 minutos. Si es necesario, ajuste el pH a 6.6. Esterilice en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- En condiciones estériles, prepare 1.000 ml de una suspensión muy homogénea de huevos frescos enteros. Lave cuidadosamente y desinfecte los huevos antes romperlos.
- Evite incluir burbujas de aire al romper y homogeneizar los huevos.
- Mezcle cuidadosamente y asépticamente 600 ml de medio básico estéril, enfriado a 45-50°C y 1.000 ml de huevos enteros, evitando la inclusión de burbujas de aire.
- Dispense el medio completo en condiciones estériles (preferiblemente tubos con tapón de rosca).
- Coagule en una posición inclinada, en un baño maría o autoclave a 85°C durante 45 minutos. Los tubos deben conservarse a +4°C en la oscuridad, evitando que se sequen.

## 5- CONSERVACIÓN

- Medio listo para usar: +2-8°C, horizontalmente y en la oscuridad
- Medio deshidratado: frasco cerrado herméticamente en un lugar seco a +15-25°C.

La fecha de caducidad y el número de lote están indicados en cada envasado.

## 6- PROCEDIMIENTO

### Material:

- Material suministrado: medio Lowenstein-Jensen.
- Material específico no suministrado:
  - Tapón de plástico
  - Glicerol para bacteriología

### Precauciones de uso / instrucciones de higiene y seguridad:

Cuando se manipulan muestras biológicas que es probable que contengan mycobacteria, deben usarse medidas de prevención (3, 4) en todo momento, en cumplimiento de los estándares actuales de seguridad para los microorganismos de clase III.

- Todas las muestras biológicas pueden inocularse en este medio después de licuefacción y descontaminación preliminares. Consúltense las recomendaciones actuales para la conservación de muestras biológicas (5).
- Como la muestra puede contener sólo una pequeña cantidad de bacterias, se concentra mediante centrifugación para aumentar la sensibilidad de detección.

### Inoculación:

Prepare una suspensión añadiendo 3 ml de agua destilada estéril al sedimento de centrifugación homogeneizado rico en bacilos e inocule 0,2 ml de suspensión por tubo.

### Incubación:

- Incube durante 28 días a 37°C en posición horizontal.
- Después de la desaparición del inóculo (3 ó 4 días) cierre herméticamente los tubos con el tapón de rosca o una tapa de plástico.

### Lectura:

- La enumeración y el examen morfológico de las colonias debe realizarse entre la 2ª y la 8ª semanas después de la inoculación.
- Las colonias de bacilos de tuberculosis sólo tienen el aspecto típico si el medio está bien oxigenado y la parte líquida del inóculo se ha evaporado plenamente. Los tubos sólo deben cerrarse después de una evaporación completa.

## 7- RENDIMIENTO / CONTROL DE CALIDAD DE LA PRUEBA

- Aspecto del medio listo para usar: pendiente de agar opaca **verde pálido**.
- Aspecto del medio deshidratado: polvo **verde-azul**.
- Los rendimientos de crecimiento del medio Lowenstein-Jensen se verifican con las siguientes cepas:

CEPAS	RESULTADO DEL CULTIVO DESPUÉS DE 28 DÍAS a 37 °C
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H 37RV – CIP 64.31	Buen crecimiento
<i>Mycobacterium aurum</i> cepa Rebuffet	Buen crecimiento

## 8- CONTROL DE CALIDAD DEL FABRICANTE

Todos los reactivos fabricados se elaboran según nuestro sistema de calidad, que va desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización final del producto. Cada lote se somete a valoraciones de control de calidad y sale al mercado sólo cuando está de acuerdo con los criterios de aceptación predefinidos. Los registros relativos a la producción y al control de cada lote se conservan en Bio-Rad.

## 9- LÍMITES DE USO

- Aparte de las mycobacterias, las *Nocardia* también crecen en medio de Lowenstein-Jensen (6).
- Es preferible usar el medio Coletsos para los cultivos de *M. bovis*.
- La ausencia de crecimiento no indica necesariamente la ausencia de infección mycobacteriana. Hay determinados factores que pueden impedir el crecimiento de mycobacteria.
- Se recomienda realizar una prueba de esterilidad sobre una muestra de cada lote de medio elaborada del medio deshidratado.
- Deben realizarse pruebas complementarias para identificar la especie de la cepa aislada.

## 10- BIBLIOGRAFÍA

1. LOWENSTEIN, Deut. Med. Wsch., 1930, 1010, Bakt., 1931, 120.
2. JENSEN K.A., Acta Tub. Scand., 1940, **14**, 125.
3. Mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les industries et les laboratoires de recherche et d'enseignement où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes - Arrêté du 13 août 1996 - Journal Officiel de la République Française.
4. Kent P.T., and KUBICA G.P. 1995. Public health mycobacteriology a guide for the level III laboratory. USDHMS, Centers for Disease Control, Atlanta.
5. Basic Laboratory Procedures Clinical Bacteriology. World Health Organization. Geneva. 1991. 1<sup>st</sup> edition.
6. HOSTY, T.J. *et al.*, J. Clin. Med., 58 : 107, 1961.



### Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré  
92430 Marnes-la-Coquette France  
Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00  
Fax : +33 (0) 1 47 41 91 33  
[www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)



12/2011

