



REVISTA

DEL COLEGIO DE MICROBIÓLOGOS Y QUÍMICOS CLÍNICOS DE COSTA RICA

Volumen 23, Nº 2 • Mayo - agosto, 2017 • ISSN:22153713

Mayo - agosto

CONTENIDO

Artículos

- Semántica y fonética de las terminologías de laboratorio, ¿Utilizamos los términos correctos?
- Aseguramiento y control de calidad en la producción de medios de cultivo microbiológicos
- Leucemias agudas: análisis epidemiológico de los pacientes referidos al servicio de Hematología del Hospital Maximiliano Peralta Jiménez de Cartago
- Hemoglobina glicada falsamente elevada en paciente diabético con hemoglobina Raleigh.
- Tuberculosis abdominal: un reto diagnóstico. A propósito de un caso clínico
- Caso importado de malaria por *Plasmodium vivax* detectado en un centro asistencial de la CCSS
- *Plasmodium falciparum* en Costa Rica. Reporte de un caso

Cartas al editor

- El paludismo, la quinina y la cinchona. Algo para recordar
- Primer Simposio del Grupo Costarricense de Medicina Transfusional

Aseguramiento y control de calidad en la producción de medios de cultivo microbiológicos

Assurance and quality control in the production of microbiological culture media

Ana Cristina Monge-Montero¹

Resumen:

El aseguramiento y control de calidad de los medios de cultivo que se utilizan para las labores de microbiología, debe ser eje central para establecer la calidad de todos los análisis que se ligan a su utilización. Se hace necesario asegurar no sólo la esterilidad de los mismos, sino también un funcionamiento adecuado a su concepción, de modo reproducible, trazable y estandarizado. Es así, como existen muchas metodologías referenciadas, de las cuales se debe seleccionar la más idónea para los servicios de análisis que se brindan. Este artículo selecciona algunas metodologías estandarizadas de reciente publicación que podrían contribuir con las actividades que se realizan en los laboratorios microbiológicos tanto a nivel clínico como no clínico. Estas metodologías buscan estandarizar a nivel mundial los procesos relacionados a las labores de análisis, de este modo fomentar la reproducibilidad de los resultados. Si bien es cierto, no son de aplicación obligatoria, permiten mejorar la calidad de los ensayos que se realizan y por ende deben contemplarse como una actualización profesional para el gremio.

Palabras clave: Medios de Cultivo, control de calidad.

Abstract:

Assurance and quality control of culture media used in microbiology, must be a central axis to establish the quality of all analysis that are linked to its use. It is necessary to ensure not only the sterility of them, but also a performance suitable to its conception, being reproducible, traceable and standardized. So, as there are many referenced methodologies, it must be selected the most suitable for analytical services provided. This article selects some standardized methodologies recently published that could help with the activities carried out in microbiological laboratories, both clinical and non-clinical level. These methodologies seek to standardize global processes related to the work of analysis, promoting the reproducibility of the results. While it is true, they are not mandatory, they allow to improve the quality of trials that are performed and therefore should be considered as a professional updating for the guild..

Key words: Culture media, quality control

Los medios de cultivo, a través de sus diferentes composiciones han permitido realizar el crecimiento y aislamiento de diferentes microorganismos, desde la identificación de patógenos de importancia en salud pública, detección de microorganismos que causan deterioro, cuantificación de microorganismos en instrumentos o medicamentos que pueden afectar la salud de los consumidores, determinaciones de citogenética, mantenimiento de bancos de células, hasta el crecimiento de microorganismos para ser utilizados en procesos biotecnológicos y la producción de vacunas y/o antibióticos ^(1,2).

Para lograr asegurar que un medio de cultivo es apto para ser utilizado, no debe asegurarse únicamente su esterilidad; se debe asegurar que el mismo es funcional para lo que se diseñó y formuló. Asimismo, se debe asegurar que todo el proceso se esté llevando a cabo dentro de las condiciones ambientales adecuadas. En la preparación de los medios de cultivo se deben siempre seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio y las indicaciones de los fabricantes, tanto dentro de la seguridad ocupacional como de la responsabilidad ambiental ⁽³⁾.

Aseguramiento de la calidad

Para la producción y preparación de los medios de cultivo se requiere controlar ciertas condiciones, como en cualquier proceso de producción industrial. Para lo mismo se debe seguir una lista de chequeo que incluya aspectos relacionados con la documentación, envase, fechas de producción y vencimiento, y otros datos que permitan su clasificación.

La norma ISO 11133:2015 ⁽⁴⁾, establece muchas de las pautas a seguir para el aseguramiento de la calidad. Se establecen los registros de preparación y control de condiciones, para poder realizar una trazabilidad de los productos. Se recomienda lograr una trazabilidad de cada material utilizado, lote de esterilización y cristalería utilizada. En algunos casos, se pueden solicitar certificados que indiquen los resultados de las pruebas de desempeño junto con los criterios de aceptación.

Para la preparación de medios de cultivo, se requiere una serie de insumos de laboratorio como equipos e instrumental, el cual debe cumplir ciertos requisitos de mantenimiento y calibración.

En el caso de las autoclaves, se deben utilizar indicadores biológicos para asegurar una correcta esterilización del material. Las autoclaves pueden presentar problemas de funcionamiento relacionados con los flujos de calor dentro del tanque, que pueden no ser evidentes con el uso únicamente de los indicadores biológicos, razón por la cual deben encontrarse en un plan de mantenimiento

preventivo y de verificación de su buen funcionamiento. La esterilización por medios químicos como gas, no se recomienda por el riesgo de residuos tóxicos en ciertos tipos de medios de cultivo.

El tiempo de esterilización depende de factores como la forma y tipo de envase, el tipo de medio de cultivo contenido, el volumen y la presencia de carbohidratos. El tiempo de esterilización de medios de cultivo estandarizado a 15 minutos está definido al utilizar botellas de 1 litro o menos de volumen. Envases de mayor tamaño, requieren tiempos más largos, por lo que se debe consultar la recomendación con el fabricante del equipo. En el caso de existir carbohidratos sensibles, no se debe exponer a altas temperaturas por más de 45 minutos ^(1,5).

Dentro de los problemas que se pueden asociar a un sobrecalentamiento se citan: alteración del pH, disminución en las propiedades de gelificación del agar, formación de precipitados anormales, caramerilización u oscurecimiento, pérdida de nutrientes y pérdida de propiedades selectivas o diferenciales. Algunos medios de cultivo no deben someterse a procesos dentro de una autoclave, puesto que se dañan sus componentes, tal es el caso de medios como Agar Hektoen, Agar Salmonella-Shigella y del Agar Bilis Rojo Violeta. En el caso de la sangre o huevos, que se deterioran si son sometidos a procesos de calor de esterilización, se debe asegurar la esterilidad al cumplir una serie de prerequisites en su origen, donde se compruebe que están libres de posibles inhibidores de crecimiento microbiano ^(1,5).

Puede haber problemas en la preparación de medios como los siguientes ⁽¹⁾:

- Precipitados: Podría darse por fundir en repetidas ocasiones un mismo medio solidificado, o por mantener por largos períodos de tiempo a altas temperaturas el medio fundido.
- Solubilidad incompleta: Se puede deber a un mezclado incompleto, el uso de agua de tubería, una mala calidad del medio o por una inadecuada fundición del medio previo a su esterilización.
- Medios suaves o con mala gelificación: Podría deberse a una cantidad insuficiente de Agar, mala mezcla, mala medición de masas al diluir en un volumen de agua, una caída del pH por hidrólisis de ácidos, efecto de dilución del agar por agregar demasiado inóculo en el caso del método de vaciado o por hidrólisis al calentar por mucho tiempo o refundir medios. Periódicamente, es recomendable, revisar los cultivos ambientales de las áreas de producción de medios de cultivo y así poder evitar riesgos de contaminaciones cruzadas.

En los casos que se prepare cristalería para cultivos celulares, es un requisito, realizar periódicamente una prueba de inhibidores y residuos traza, que puedan afectar el crecimiento celular.

Almacenamiento de medios de cultivo

Existen varios métodos que permiten establecer la vida útil de los medios de cultivo producidos. En casos específicos es necesario realizar estas validaciones.

Es una buena práctica en el caso de los tubos de ensayo, señalar con un marcador el volumen de algunos, antes de colocarlos en refrigeración, si el volumen se ha disminuido en un 10%, se deben descartar ^(6,4).

Se recomienda almacenar a una temperatura de 2°- 8°C, alejados de la luz directa. Algunos medios de cultivo pueden contener componentes que se alteren con la luz ultravioleta ⁽⁴⁾.

Se recomienda que los medios líquidos preparados tengan una fecha de vencimiento de alrededor de 6 meses (la norma ISO 11133:2014, expone un máximo de 3 meses sin suplementar y de 1 mes con el suplemento). Mientras que los medios sólidos preparados, tendrían una fecha de vencimiento alrededor de las 2 semanas (ISO 11133:2015 ⁽⁴⁾, expone que por el máximo de una semana). En el caso de los medios deshidratados, se recomienda conservar un recipiente no abierto no más de 2 años a temperatura ambiente ⁽⁶⁾. Una vez abierto, se recomienda utilizarlo dentro de los 6 meses siguientes, para así evitar el deterioro, así como revisar parámetros de claridad, consistencia, apariencia y color ⁽⁶⁾. Se recomienda que si el medio de cultivo se adquiere listo para ser utilizado, se debe contemplar su uso en menos de un año ^(6,7). Se recomienda que una vez fundido un medio de cultivo para utilizarse, no se debe mantener más de 4 horas sin utilizar, puesto que aumentan las posibilidades de contaminación y degradación ^(6,4).

Control de calidad del producto

El Control de Calidad asegura que el producto puede utilizarse con seguridad de que esta estéril y que funciona para lo que fue concebido. Debe existir una política de liberación de lotes aprobados y de custodia de lotes por aprobar.

Un aspecto vital a controlar es la calidad del agua. La farmacopea estadounidense ⁽⁸⁾, establece que al agua para ser usada en la preparación de medios de cultivo, debe ser purificada (destilada o desionizada). No debe contener sustancias que afecten el crecimiento celular, como por ejemplo hipoclorito de sodio.

A su vez, la norma ISO 11133:2015 /, establecen ciertos parámetros necesarios para el agua a ser utilizada en la producción de medios de cultivo. Dentro de los parámetros que se deben controlar esta la conductividad (o resistividad), el pH, el carbón orgánico total, el cloro residual total y conteo de microorganismos heterótrofos. En el caso del pH y la conductividad, se recomienda que se analice con cada uso, esto puesto que permiten detectar rápidamente cambios en el agua que puedan alterar la producción de medios de cultivo. Se establece utilizar una conductividad menor a 25 µSiemens por centímetro cuadrado, y el pH entre 5.5 y 7.5. Es por tanto necesario poder asegurar una Agua Tipo 1 ^(4,5,6,7).

Según las recomendaciones del Standard Methods of Water and Wastewater ⁽⁴⁾, se propone realizar periódicamente un análisis externo de determinación de trazas de antibióticos, pesticidas y plaguicidas, y metales pesados, puesto que los mismos pueden interferir en el crecimiento de una serie de microorganismos.

En cuanto a la calidad bacteriológica del agua utilizada en la preparación de medios de cultivo, se recomienda que la contaminación microbiana no exceda las 103 UFC / ml, y preferiblemente que sea menor a las 102 UFC / ml ^(4,6). Esta medición se debe realizar con un método validado ⁽⁶⁾.

Siempre se debe preferir agua destilada fresca, no obstante, existen casos donde es permisible utilizar agua desionizada o de osmosis inversa. En lugares donde existan altos niveles de cloración se deben utilizar mecanismos como filtros de carbón para eliminar o neutralizar el cloro residual antes de la destilación. Mientras que en lugares donde exista una dureza importante del agua, se recomienda la utilización de pre tratamientos como suavizadores de agua, tanto para la conservación de los equipos de purificación como para la calidad del agua producida.

El Control de Calidad de los medios de cultivo se basa en varias actividades, dentro de las cuales se detallan las siguientes:

a. Inspección física

Se deben realizar una lista de chequeo de las características necesarias para que cada producto cumpla con el estándar de calidad de acuerdo al tipo de medio de cultivo y a su presentación. Se deben evaluar aspectos como la decoloración, cambios de color o hemólisis (en el caso de los medios de cultivo cuyo componente sea sangre), la formación de cristales, la fuerza de gelificación, la variabilidad de la cantidad de medio de cultivo en cada envase, la distribución desigual de medio de cultivo en las placas de Petri, superficies inclinadas, con burbujas, con coágulos de medio, con hoyos o con un llenado

parcial de la placa, la deshidratación del medio de cultivo, la cual se refleja a través de superficies secas, o resquebrajadas, la contaminación evidente por hongos filamentosos, levaduras o por otros microorganismos, y otras. Si alguna de estas condiciones se presenta, lo recomendable es no utilizar el medio de cultivo ^(5,7).

b. Pruebas de esterilidad

Las pruebas de esterilidad consisten en someter los medios de cultivo preparados (se recomienda al menos el 2 - 5% del total del lote), a temperaturas ideales para el crecimiento de microorganismos que puedan ocasionar la contaminación (4). Se recomienda incubar a una temperatura de 30° – 35°C por al menos 24 horas. No obstante, es recomendable también colocar a temperatura entre 20° – 25 °C por un período de 5 días, para asegurar que tampoco hay riesgo de contaminación por hongos. En caso de verificar la contaminación del lote, se debe de retirar el mismo de uso, y realizar su descarte adecuado.

c. Pruebas de recuperación y promoción del crecimiento

Se deben utilizar cepas de referencia para generar un stock de referencia, del cual se generan los cultivos de trabajo. Nunca se deben utilizar cepas subcultivadas de muestras para preparar stocks de referencia por la variabilidad de las mismas. En ciertos casos es recomendable también utilizar cepas autóctonas, puesto que permite realizar una simulación de las cepas que se buscan aislar.

Se recomienda que al recibir una cepa de una colección como la ATCC o de otro organismo autorizado, se deben activar y probar su pureza e identidad, previo a su preservación. Si se considera puro, se pueden preparar ampollas secas las cuales se conservan a temperaturas de congelación (-70 a -20°C), o se pueden preparar caldos o medios cubiertos con glicerol para asegurar la viabilidad por más tiempo y minimizar la variabilidad. Estas ampollas son las que se consideran de referencia o “Master”. Se deben preparar de 3 – 12 ampollas las cuales conforman el stock de referencia. El “Master” se puede almacenar a -20°C por 0,5 a 2 años⁽⁴⁾.

El Stock de referencia es utilizado para generar los cultivos de trabajo, que se usan diariamente. Las cepas a utilizar para estas pruebas no deben exceder las 5 generaciones desde la apertura de la ampolla liofilizada, es decir, no deben exceder los 5 pasajes en medios de cultivo (aplicable también al caso de utilizar cepas autóctonas del ambiente). Los cultivos de trabajo se pueden almacenar un máximo de 4

semanas a 4°C. A partir de los cultivos de trabajo se preparan las soluciones estandarizadas de células para ser utilizadas en el control de calidad ⁽⁴⁾.

Para preparar las soluciones estandarizadas, se pueden seguir varias estrategias. Las diluciones de bacterias se pueden realizar en soluciones buffer de cloruro de peptona o buffer de fosfatos, en el caso de los hongos se recomienda más utilizar el bufer de polisorbato 80. La inoculación no debe ser mayor a 100 Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Las diluciones deben ser utilizadas dentro de las 2 horas siguientes, o se pueden almacenar de 2-8 °C por 24 horas. Para calcular las 100 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se puede realizar a través de un conteo manual, conteo automatizado a través de un citómetro de flujo, diluciones y plaqueo, o lo más utilizado, que es realizar una curva para determinar la cantidad aproximada de células de acuerdo a turbidez o nefelometría ⁽⁴⁾.

Existen algunos parámetros que a evaluar y registrar a los medios de cultivo cuando se comparan contra un medio de cultivo de referencia o previamente aprobado ⁽⁴⁾:

Productividad

Se utiliza, cuando se quiere demostrar el crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo. La productividad debe alcanzar un crecimiento mínimo de 70% de los microorganismos en medios no selectivos. En el caso de medios de cultivo selectivos, debe alcanzar un mínimo de un 50%.

La razón de productividad se obtiene con la siguiente fórmula:

$$Pr = \frac{N_s}{N_o}$$

Donde N_s es el conteo total de colonias obtenido en el medio de cultivo a probar, y N_o , se refiere al conteo total obtenido en el medio de cultivo de referencia o considerado como modelo, el cual debe ser mayor o igual a 100 UFC.

En lo que respecta a evaluaciones cualitativas, la revisión visual se realiza y se le asigna una interpretación.

• Selectividad

Se utiliza cuando lo que se quiere es demostrar que un medio de cultivo inhibe el crecimiento de algún microorganismo o para seleccionar algún microorganismo.

Métodos para medios sólidos (cuantitativo)

Se debe lograr alcanzar un crecimiento mínimo de 50% del microorganismo blanco en el medio selectivo. El microorganismo blanco, sería el que se esperaría recuperar en el medio selectivo. Los microorganismos no blancos, se deben usar en concentraciones por debajo de 104 UFC por ml y los blancos a concentraciones de 106 a 108 UFC por ml.

Se calcula el Factor de Selectividad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S_F = D_o - D_s$$

Todos los valores son expresados en Log10. D_o es la mayor dilución que mostró crecimiento de al menos 10 colonias en un medio no selectivo de referencia. D_s es la mayor dilución que mostró un crecimiento comparable en el medio selectivo. El valor de S_F en la mayoría de los medios selectivos debe ser de al menos 2.

Método para medios sólidos o líquidos (semicuantitativo).

Es un método donde se realiza una inoculación de las placas con un asa en la superficie del medio de cultivo, a modo de estrías paralelas. Se pueden probar varios microorganismos a la vez, siempre y cuando no se crucen y no haya un efecto inhibitorio entre ellas.

Para esta prueba, se realiza una interpretación trinomial: “0” no hay crecimiento, “1” crecimiento débil y “2” crecimiento óptimo. Con el microorganismo blanco, se debe alcanzar un “2” y tener una apariencia típica, en lo que respecta a tamaño y a morfología. El

crecimiento de los microorganismos no blanco, debe ser parcialmente o completamente inhibido, por lo que alcanzarían un valor de “1” o de “0”.

Para el caso de medios líquidos, se sigue el mismo procedimiento, pero la escala se modifica: “0” no hay turbidez, “1” turbidez ligera y “2” turbidez abundante. El microorganismo blanco debe alcanzar un valor de 2. Se pueden revisar además características de producción de gas, cambios de color y otras.

Especificidad o pruebas para microorganismos específicos (control positivo / negativo)

Ciertos medios de cultivo diferenciales, tienen propiedades que permiten diferenciar los microorganismos gracias a propiedades bioquímicas resultado de su metabolismo.

Cada laboratorio debe establecer sus criterios de aceptación y de rechazo de los lotes de medios de cultivo. No obstante, se presenta un resumen de los recomendados por la literatura ⁽⁴⁾:

d. Método ecométrico

Este método es el más ampliamente utilizado para medios de cultivo sólidos dada su facilidad de utilización y de interpretación. Se basa en la dilución por rayado hasta la extinción. En si permite proporcionar información e índices absolutos y relativos de crecimiento microbiano para evaluar desde el crecimiento en un medio de cultivo nutritivo hasta el crecimiento en medios selectivos, diferenciales o con inhibidores.

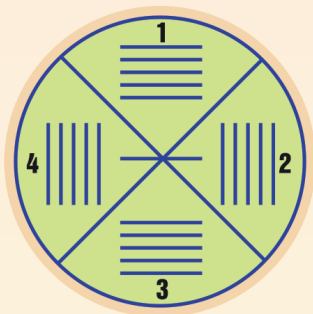
Para este método se recomienda un muestreo del 5 – 10% del total del lote producido.

Interpretación de resultados de recuperación para aceptación de lotes.

Tipo de método	Cuantitativo	Cualitativo
Productividad	>70% (organismo blanco) en medio no selectivo >50% (organismo blanco) en medio selectivo < 25% microorganismos no blanco	*
Selectividad	>2 Log	*
Especificidad	Se rechaza si no se produce la morfología o tamaño característico, o no hay respuesta bioquímica esperada. Se rechaza si falla en suprimir la flora de fondo	Se rechaza si no se produce la morfología o tamaño característico, o no hay respuesta bioquímica esperada. Se rechaza si falla en suprimir la flora de fondo

Se prepara una solución de trabajo del microorganismo en cuestión a una concentración de entre el 4,4 y 5,5 según la escala McFarland. Es muy importante, que a la hora de preparar esta solución, se utilicen cultivos recientes de microorganismos, para permitir que se encuentren en una fase de crecimiento exponencial. Se recomienda siempre usar cultivos de no más de 24 horas.

Con un asa se coloca 1 µL de la solución según se indica en el dibujo siguiente:



Fuente: Leal, Marco.⁽³⁾

Se sigue el orden de rayado, primero el cuadrante A, después el B, y así sucesivamente. El asa se debe levantar entre cada rayado. Al final se realiza un rayado final en el centro de todos los cuadrantes.

Los platos o placas de Petri, son incubados durante 24 horas y se verifica la presencia de colonias en cada estria. La incubación para bacterias es de 24-48 h a 36 ± 1° C, y para las cepas de hongos 36-72 h a 25 ± 2° C.

Se realiza una interpretación numérica de acuerdo a un índice de crecimiento absoluto (ICA), según la tabla siguiente:

Quadrante A	Quadrante B	Quadrante C	Quadrante D	Estria Central
A1 = 0,2	B1 = 1,2	C1 = 2,2	D1 = 3,2	0,5
A2 = 0,4	B2 = 1,4	C2 = 2,4	D2 = 3,4	
A3 = 0,6	B3 = 1,6	C3 = 2,6	D3 = 3,6	
A4 = 0,8	B4 = 1,8	C4 = 2,8	D4 = 3,8	
A5 = 1,0	B5 = 2,0	C5 = 3,0	D5 = 4,0	

Si existe crecimiento en todas las estrias, se asigna un valor de 5,0. Si sólo hay crecimiento en la primera estria de todas se asigna un valor de 0,2. Así sucesivamente se va obteniendo un índice de acuerdo al crecimiento.

Los criterios deben ser propios de cada laboratorio, no obstante, algunos laboratorios utilizan los criterios unificados siguientes: Si es un medio no selectivo, se utiliza un ICA mínimo de 3,5. Para medios selectivos y/o diferenciales con la cepa blanco se utiliza un ICA mínimo

a 3,0. En caso de que sea medios con inhibidores, donde se espere un crecimiento negativo, lo máximo que se acepta es un ICA de 2,0.

Cada laboratorio debe establecer cuales metodologías son las más idóneas para su trabajo, tanto respecto a los servicios que brinda como a la factibilidad económica de realizar estas pruebas. En su mayoría, estas metodologías son las que la Organización Internacional de Estandarización propone como mecanismos de estandarización y reproducibilidad de los procesos a nivel mundial, por lo que es necesario que en el quehacer microbiológico se contemplen estos lineamientos como parte de la actualización profesional. De este modo, poder preveer los cambios que se podrían aproximar para la microbiología costarricense y la calidad de los resultados que se están emitiendo en nuestros laboratorios.

Referencias

- 1.- Bridson, Y. 2006. The Oxoid Manual. 9th edition. Oxoid Limited: Hampshire, England.
- 2.- Corry, J. et al. Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. 2012. 3rd edition. RCS Publishing: Cambridge, UK.
- 3.- Leal, Marco. Eficacia antibacteriana de extractos de plantas: aplicación clínica en mastitis bovina. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 2014. 17(1), 179-187.
- 4.- ISO/TS 11133-1:2014: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Guidelines on preparation and production of culture media -- General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory. (Microbiología de alimentos y de alimentos para animales -- Lineamientos para la preparación y producción de medios de cultivo). ISO: USA.
- 5.- Simbco, M.J. et al. Difco & BBL Manual of Microbiological Culture Media. Second Edition. Becton, Dickinson and Company: Maryland, USA.
- 6.- Standard Methods of water and wastewater analysis. APHA, 2006. USA
- 7.- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (NCCLS). Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Media, M22-A3. 2004. Third Edition. 24 (19).
- 8.- United States Pharmacopeial Convention, Inc. 2008. The United States Pharmacopeia. On line. Maryland, USA