

## **CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO**

Maricela Esteban Méndez, Manuel Quintos Escalante, Alicia Herrera Benavides

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango.

Instituto Politécnico Nacional.

Sigma 119. Fraccionamiento 20 de Noviembre II Durango, Dgo. C.P. 34 220. Becarios COFAA

### **RESUMEN**

La evaluación de la calidad de medios de cultivo es un requisito esencial en los laboratorios de microbiología. Una serie de procesos han sido desarrollados para permitir la comparación de la eficacia de los lotes de medios de cultivo líquidos y sólidos preparados en el laboratorio. Los parámetros que se determinan son la estimación del índice de productividad (PR), el factor de selectividad (SF), porcentaje de recuperación bacteriana, y promoción de crecimiento, para los cuales varios criterios de aceptación se han recomendado. En este trabajo se presenta una revisión de esos procesos.

**PALABRAS CLAVE:** calidad, medios de cultivo, microbiología

### **ABSTRACT**

The quality assessment of culture media is an essential requirement in microbiology laboratories. A number of processes have been developed to allow comparison of the effectiveness of batch liquid culture media and laboratory prepared solid. The parameters are determined by estimating the productivity ratio (PR), the selectivity factor (SF), percentage of bacterial recovery, promote growth, to which several acceptance criteria have been recommended.

**KEY WORDS:** quality, culture media, microbiology

### **INTRODUCCIÓN**

Los sistemas de gestión de calidad de los laboratorios se establecen bajo los criterios de la norma NMX-EC-17025-IMNC-2006. Requisitos generales. Los laboratorios de ensayo y calibración deben de cumplir con una serie de requisitos administrativos y técnicos que determinan la confiabilidad de los resultados. Entre los requisitos administrativos la norma menciona que el laboratorio debe presentar una organización definida, un manual de calidad, y procedimientos para el control de documentos, compras, atención a clientes, subcontrataciones y quejas. Los requisitos técnicos son que el laboratorio cuente con personal competente, condiciones ambientales adecuadas, con equipos calibrados, y reactivos y materiales verificados. Por esa razón, los laboratorios de ensayos microbiológicos acreditados deben de llevar a cabo el control de la calidad de los reactivos utilizados, principalmente de los medios de cultivo. Este es un proceso continuo y es uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la confianza y competencia técnica de los resultados que se emiten (NMX-EC- 17025-IMNC-2006).

Los medios de cultivo deben de cumplir con una serie de requisitos que marca la norma ISO/TS 11133 parte 1 y 2 en la que se menciona que al adquirir un medio se debe solicitar las especificaciones de calidad, el nombre del medio, la lista de componentes con las cantidades, la fecha de caducidad, el número de lote y las condiciones de almacenamiento. La calidad de los medios de cultivo preparados en el laboratorio depende de su formulación correcta, de los procedimientos de preparación, de la eliminación de

los agentes microbianos contaminantes, y de las condiciones adecuadas de envasado y almacenamiento (ISO/ TS 11132-1: 2009; ISO/ TS 11132-2: 2003).

### **PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO**

Para la preparación de los medios de cultivo se siguen las indicaciones del fabricante, sin embargo en algunos casos los medios se preparan a partir de cada uno de sus diferentes componentes. Se debe utilizar agua destilada que haya sido sometida a controles que aseguren su calidad. Los principales análisis que se realizan al agua son: conductividad, pH, determinación de mesofílicos aerobios y determinación de metales pesados (Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater, 2005).

Otro aspecto a tener en cuenta es el correcto lavado del material de vidrio. El laboratorio debe contar con un procedimiento para esta actividad en el que se especifica que el material contaminado debe esterilizarse y posteriormente lavarse usando una solución de detergente neutro, el enjuague debe ser con agua de la llave, posteriormente con agua destilada, y como paso final se realiza la prueba con azul de bromotimol para determinar la eliminación de residuos alcalinos o ácidos (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2008).

### **CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO**

Una vez que se ingresa un medio de cultivo al laboratorio se debe identificar con una clave, registrar la fecha de recepción, la de apertura y la de caducidad. El almacenamiento debe realizarse en las condiciones especificadas por el fabricante.

Los envases deben estar herméticamente cerrados, especialmente cuando se trate de medio deshidratados. No es recomendable utilizar medios deshidratados que presenten apelmazamiento o un cambio de color.

Se debe verificar que los medios de cultivo y diluyentes preparados por el laboratorio tengan las características adecuadas con respecto a:

- Esterilidad
- Propiedades físicas: pH, color
- Productividad o promoción de crecimiento: Recuperación o supervivencia de los microorganismos de interés.
- Selectividad: Inhibición de los microorganismos no deseados.
- Porcentaje de recuperación bacteriana. Es el rendimiento o recuperación de un microorganismo que se espera que se desarrolle en el medio de cultivo.

### **Control de esterilidad de los medios de cultivo**

Este procedimiento se lleva a cabo cada vez que se prepara un lote de medio de cultivo o diluyente. Los medios de cultivo preparados se incuban en estufa a 35 °C durante 24h. Esta prueba se realiza sobre el 5% del lote preparado. El criterio de aceptación es que no debe haber crecimiento, si se presenta desarrollo se rechaza el lote.

### **Pruebas de funcionalidad de medios de cultivo.**

Para evaluar los medios de cultivo se usa una cepa de referencia apropiada para el medio de acuerdo a la norma ISO/TS 11133-2:2000. A partir de la cepa de trabajo, se prepara un cultivo en fase estacionaria en un caldo no selectivo por ejemplo, caldo nutritivo o caldo infusión cerebro corazón, con este cultivo se realizan las pruebas correspondientes para cada medio de cultivo.

### **Prueba de promoción de crecimiento**

Para los medios de cultivo líquidos se realiza la prueba de promoción de crecimiento para evaluar su productividad y selectividad.

#### **Productividad en medios líquidos**

Del cultivo en fase estacionaria se inoculan por separado 100, 10, 1, UFC/ mL en el medio a probar, se incuba a la temperatura y tiempo correspondiente y se observa el desarrollo en cada uno de los tubos inoculados con el microorganismo de prueba.

Si el medio de cultivo es conforme se espera que haya desarrollo en todos los tubos inoculados y el lote de medio se acepta.

#### **Selectividad**

Para llevar a cabo la prueba de la selectividad se emplea un microorganismo que se inhibido por el medio de cultivo selectivo por ejemplo para el caldo lauril sulfato se evalúa el desarrollo del microorganismo que si crecen y otro que es inhibido por el medio de cultivo. En este caso la cepa que sí crece en el medio de cultivo es *Escherichia coli* ATCC 25922 y la cepa que se inhiben es *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. El criterio de aceptación es observar crecimiento (turbidez) y producción de gas en los tubos inoculados con *E. coli* e inhibición del desarrollo de *E. faecalis* (ISO/ TS 11132-1: 2009).

#### **Porcentaje de recuperación bacteriana**

Es el rendimiento o recuperación de un microorganismo que se espera que se desarrolle en el medio de cultivo. Este parámetro aplica únicamente para agares empleados en la técnica de cuenta en placa por ejemplo en un medio de cultivo agar cuenta estándar se evalúa el adecuado desarrollo de las cepas de prueba, empleando agar soya tripticaseína como medio de cultivo de referencia.

El porcentaje de recuperación bacteriana (PR) es definido como sigue:

$$PR = (Ns / No) (100)$$

Donde:

Ns: es la cuenta total de colonias obtenida en el medio de cultivo a probar

No: es la cuenta total de colonias obtenida en el medio de cultivo de referencia y debe ser  $\geq 100$  UFC/mL.

Si en cada lote de preparación el porcentaje de recuperación bacteriana es  $\geq 70$  % se considera aceptable (Standard Methods for the Examinations of Dairy Products, 2004).

#### **Selectividad y especificidad de medios de cultivo selectivos**

##### **Prueba Ecométrica**

Con esta prueba se evalúa la selectividad y especificidad de medios de cultivo selectivos. Se emplean tres microorganismos que se desarrolla en el medio de cultivo y tres cepas de microorganismos que son inhibidos en el medio de cultivo.

De cada microorganismo se prepara un cultivo en fase estacionaria y se siembra con un asa calibrada de 1  $\mu$ L trazando sobre la superficie del medio de cultivo en forma paralela 5 estrías sobre cada cuadrante y una estría central sin esterilizar y recargar el asa, como se muestra en la Figura 1. Las cajas Petri se incuban a 35° C durante 24 horas, y después se efectúan las lecturas teniendo en cuenta que cada estría tiene un valor de 0.2 y la estría central de 1.0.

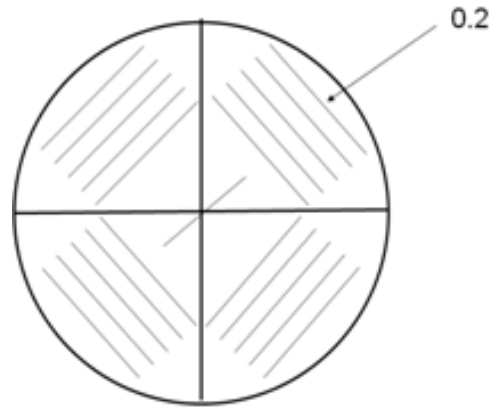


Figura 1.- Representación de la forma en la que se debe sembrar para la prueba ecométrica.

Si hay crecimiento en las cinco estrías de los cuatro cuadrantes y la estría central, el índice de crecimiento tiene un valor de 5.

Criterios de aceptación: 555-000

555-000

555-000

#### Prueba de Selectividad en Agares selectivos

La prueba de selectividad se evalúa con el método ecométrico determinando la inhibición o crecimiento de los microorganismos de prueba así como la morfología colonial (Figura 2).

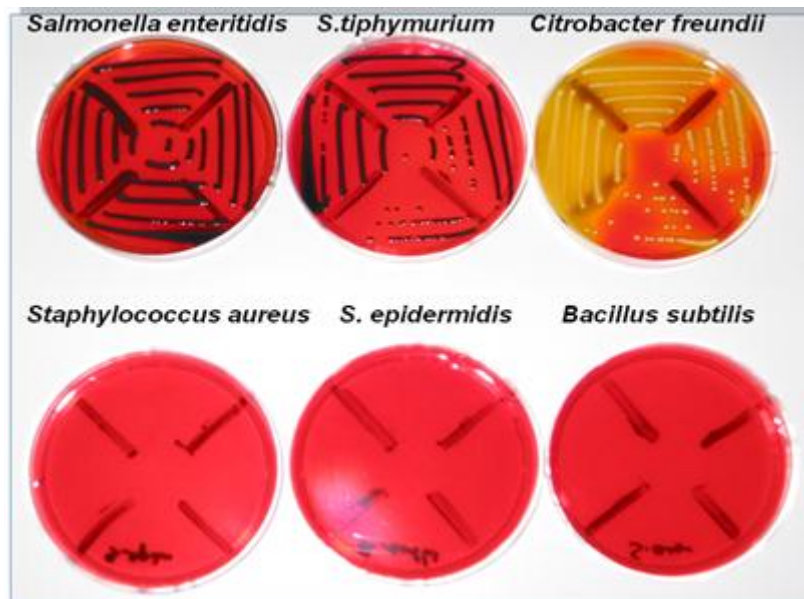


Figura 2. Prueba Ecométrica de agar xilosa lisina desoxicolato, se sembraron tres cepas que crecen en el medio de cultivo (*S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *C. freundii*) y tres cepas que son inhibidas (*S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis*).

### **Almacenamiento de los medios de cultivo**

Se debe determinar y verificar el período de validez de los medios preparados en las condiciones de conservación especificadas. Se debe observar el cambio de color, la evaporación, la deshidratación, y si ocurre crecimiento microbiano. En general los medios preparados se guardan a 4° C, no más de tres meses (ISO/ TS 11132-1: 2009; ISO/ TS 11132-2: 2003).

### **Informe de Control de calidad**

El informe como mínimo debe contener nombre del medio de cultivo evaluado, número de lote de medio evaluado, fecha de realización del análisis, cepa usada (género y especie del microorganismo, y clave), medio de referencia usado para evaluar la productividad, los resultados de productividad, selectividad, promoción de crecimiento, prueba ecométrica, porcentaje de recuperación bacteriana, prueba de esterilidad y pH.

### **CONCLUSIONES**

La confiabilidad y reproducibilidad de los resultados de los análisis microbiológicos dependen de la calidad de los medios de cultivo y estos deben cumplir con los criterios de aceptación del pH, prueba de esterilidad, selectividad, porcentaje de recuperación y productividad.

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ISO/TS 11132-2: 2003 Microbiología de alimentos y alimento para animales- Directrices para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte 2 Directrices practicas para las pruebas de rendimiento de medios de cultivo.
- ISO/TS 11132-1: 2009. Microbiología de alimentos y alimento para animales- Directrices para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte1. Directrices generales sobre el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2008. Limpieza del Material de vidrio. 31. Rockville.
- NMX-EC- 17025-IMNC-2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- Standard Methods for the Examinations of Dairy Products. 2004. (Eds: Michael, H. W, J. F. Frank) American Public Health Association. Washington, D C.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2005. American Public Health Association. Washington, D C.