BBL Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)
y
BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) - Bi-Plate

L007379 • Rev. 09 • Diciembre 2006

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) (agar selectivo para estreptococos de grupo A con sangre de carnero al 5%) es un medio selectivo para uso en el aislamiento e identificación presuntiva de estreptococos del grupo A a partir de cultivos faríngeos y otras muestras. **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) (agar de soja **Trypticase** con sangre de carnero al 5%) se utiliza para el crecimiento de organismos exigentes y para la visualización de reacciones hemolíticas. El sector del medio TSA II está marcado con un "I" y el sector del medio **ssA** está marcado con un "II" en la biplaca.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

A. Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood

1. Inocular muestras representativas con los cultivos diluidos a una concentración de 10^3 a 10^4 UFC/0,01 mL.
   a. A cada placa, añadir 0,01 mL de la dilución y extender la muestra para su aislamiento. Insertar el inóculo en el área primaria antes de extender al resto de la placa.
   b. Colocar un disco **Taxo** A en la intersección entre la primera y segunda áreas de extensión en todas las placas inoculadas con cepas de *S. pyogenes*.
   c. Incubar las placas a una temperatura de 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.
   d. Incluir placas de agar de soja **Trypticase** con sangre de carnero al 5% (TSA II) como controles no selectivos para todos los organismos.
2. Después de 18 – 24 h, examinar si las placas presentan beta-hemólisis en el área de inoculación y determinar la cantidad de crecimiento, inhibición, tamaño de las colonias y reacciones hemolíticas. Efectuar la lectura y registrar el tamaño de la zona alrededor del disco **Taxo** A con *S. pyogenes*.
3. Resultados previstos

Streptococcus pyogenes (2 cepas) *ATCC 19615 ATCC 51574	Crecimiento de regular a denso (según la cepa y la dilución) de colonias diminutas a muy pequeñas rodeadas de zonas con beta-hemólisis. Una zona de inhibición de crecimiento se presenta claramente alrededor del disco **Taxo** A.
Streptococcus mitis ATCC 6249	Inhibición parcial
**Staphylococcus aureus* ATCC 25923	Inhibición completa
Neisseria subflava ATCC 14799	Inhibición completa
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Inhibición completa

*Cepa de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

B. Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

1. Inocular muestras representativas con diluciones de los cultivos enumerados a continuación.
   a. Con una pipeta volumétrica o método equivalente, suministrar 0,01 mL de una dilución con una concentración de 30 – 300 UFC a cada placa e inocular mediante extensión por medio de un esparcidor de vidrio estéril.
   b. Incubar la cepa de *Staphylococcus* a 35 ± 2 °C en atmósfera aerobia y las cepas de *Streptococcus* a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.

2. Examinar las placas después de un período entre 18 y 24 h para comprobar la extensión del crecimiento, el tamaño de las colonias y las reacciones hemolíticas.
3. Resultados previstos

   Organismos de control CLSI (cepas ATCC)
   **Streptococcus pyogenes*..... Crecimiento, beta-hemólisis.
   (19615)
   **Streptococcus pneumoniae*..... Crecimiento, alfa-hemólisis.
   (6305)
   **Staphylococcus aureus* ..... Crecimiento
   (25923)
   **Escherichia coli*..... Crecimiento
   (25922)

   *Cepa de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar las placas como se describe en la sección "Deterioro del producto".
2. Examinar visualmente las placas representativas para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
3. Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de 7,4 ± 0,2 en ambos medios.
4. Tomar en cuenta la firmeza de las placas durante el procedimiento de inoculación.
5. Incubar las placas representativas sin inocular a 35 ± 2 °C durante 72 h y examinar para detectar contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) se recomienda como medio en placa selectivo primario para el aislamiento primario de los estreptococos del grupo A (*S. pyogenes*) a partir de cultivos faríngeos y otras muestras en la que se sospecha la presencia de *S. pyogenes*. Los estreptococos del grupo B también crecen en este medio; se inhibe la mayoría de los demás estreptococos, neisseriae, estafilococos y bacterias gram negativas. El medio está diseñado para su uso conjuntamente con discos **Taxo** A (bacitracina, 0,04 de unidad) para la identificación presuntiva de *S. pyogenes*.

Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) se utiliza para el cultivo de microorganismos exigentes y para la visualización de las reacciones hemolíticas producidas por numerosas especies bacterianas.

V RESUMEN Y EXPLICACION

La infección con estreptococos del grupo A Lancefield (*Streptococcus pyogenes*) puede dejar secuelas graves tales como fiebre reumática y glomerulonefritis aguda. Por tanto, son importantes la detección e identificación precoces.

Dada su composición nutritiva, el agar de soja **Trypticase** se ha convertido en un medio de uso muy extendido, ya sea sin suplementos o como base para medios con sangre. **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) se utiliza para la recuperación y el cultivo de especies microbianas exigentes y para la determinación de reacciones hemolíticas importantes para las características de diferenciación de bacterias, especialmente la especie *Streptococcus*.

Debido al crecimiento excesivo de la flora normal presente en las muestras de cultivo faríngeo colocadas en placas de agar sangre de rutina, se han añadido elementos selectivos al agar sangre de carnero para favorecer la detección de los estreptococos del grupo A.

La evaluación de diversos agentes antimicrobianos en nuestros laboratorios dio como resultado una combinación con selectividad mejor, en comparación con otros medios selectivos analizados. Este medio (**ssA**) permite la identificación presuntiva de los estreptococos del grupo A, según la sensibilidad a la bacitracina y la beta-hemólisis, dentro de las 24 h después de la inoculación con la muestra cuando el medio es incubado en atmósfera enriquecida con CO_2[1].

La biplaca dividida, con el agar sangre no selectivo (TSA II) en el sector marcado como "I" y el agar sangre selectivo (**ssA)** en el sector marcado como "II", permite la recuperación de los estreptococos del grupo A y la evaluación de la microbiota total de la muestra en una placa.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La combinación de caseína y peptonas de soja en la base de agar de soja **Trypticase** hace que el medio sea altamente nutritivo al suministrar nitrógeno orgánico. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico.

La sangre de carnero desfibrinada proporciona reacciones hemolíticas apropiadas de los estreptococos. Además, se inhibe el crecimiento de *Haemophilus hemolyticus*, un no patógeno con colonias hemolíticas no distinguibles de las de los estreptoccos beta-hemolíticos.

Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) proporciona crecimiento y beta-hemólisis excelentes por parte de *Streptococcus pyogenes* (grupo A Lancefield) y también proporciona crecimiento excelente y reacciones hemolíticas apropiadas con otros organismos exigentes. Es adecuado para uso con discos de bacitracina (**Taxo** A) de baja concentración (0,04 de unidad) para la identificación presuntiva de los estreptococos del grupo A (*S. pyogenes*).

Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) incorpora una combinación singular de elementos selectivos en **Trypticase** Soy Sheep Blood Agar (TSA II) para suprimir la flora faríngea normal y favorecer la recuperación de *S. pyogenes*. La sangre de carnero desfibrinada suministra enriquecimiento para el crecimiento de tales organismos exigentes y permite la detección de la beta-hemólisis característica de *S. pyogenes*. Los estreptococos beta-hemolíticos que muestran una zona de inhibición alrededor de un disco de bacitracina (0,04 de unidad) pueden ser identificados presuntivamente como estreptococos del grupo A.

VII REACTIVOS

Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (ssA)
Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	14,5	g
Digerido papaico de harina de soja	5,0	g
Cloruro sódico	5,0	g
Agar	14,0	g
Factores de crecimiento	1,5	g
Agentes selectivos	40,2	mg
Sangre de carnero, desfibrinada	5%	

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)
Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína	14,5	g
Digerido papaico de harina de soja	5,0	g
Cloruro sódico	5,0	g
Agar	14,0	g
Factores de crecimiento	1,5	g
Sangre de carnero desfibrinada	5%	

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones
Para uso diagnóstico *in vitro*.

Si se observa humedad en exceso, invertir la parte inferior sobre una tapa desplazada y permitir que se seque al aire para impedir que se forme una barrera estanca entre la parte superior y la inferior de la placa durante la incubación.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar" [2-5] y las directrices del centro. Después de su uso, las placas preparadas, los recipientes de muestra y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Instrucciones para el almacenamiento
Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a 2 – 8 °C. No congelar ni sobrecalentar. No abrir hasta que vayan a utilizarse. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Las placas preparadas almacenadas en su envase original a una temperatura de 2 – 8 °C hasta momentos antes de su utilización pueden inocularse hasta su fecha de caducidad e incubarse durante los períodos de incubación recomendados. Permitir que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto
No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras faríngeas adecuadas para cultivo pueden obtenerse pasando una torunda con cabeza de poliéster o poliuretano por la faringe y área de las amígdalas en la garganta, teniendo cuidado de no tocar la lengua ni la campanilla. (Nota: Si también se utilizan torundas con pruebas de detección directa de antígenos, se requiere el uso de torundas de poliéster, rayón o poliuretano sobre soportes de plástico; por ejemplo, los sistemas de recogida y transporte **CultureSwab** y **CultureSwab** EZ). Las muestras diferentes de las faríngeas deben cultivarse según los procedimientos recomendados. Se deben consultar los textos correspondientes para obtener información detallada[6,7].

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado
Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) y **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) - Bi-Plate

Materiales necesarios pero no suministrados
Medios de cultivo auxiliar, reactivos, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio que se requiera.

Procedimiento de análisis
La superficie del agar debe estar lisa y húmeda, pero sin humedad en exceso.

Extender las muestras tan pronto como sea posible después de recibirlas en el laboratorio. La placa de extensión se utiliza principalmente para aislar los cultivos puros de las muestras con flora mixta. Si, por el contrario, el material se cultiva directamente empleando una torunda, hacerla girar en una sección pequeña cercana al borde, extendiendo luego a partir de esta área inoculada. Sin volver a esterilizar el asa, insertar el inóculo dos o tres veces en las zonas de agar de inoculación más densa.

Al utilizar esta placa con la misma muestra, inocular primero el lado de TSA II, marcado con un "I". Luego, inocular el lado de **ssA**, marcado con un "II", y colocar un disco **Taxo** A en la sección inoculada con la torunda de dicho lado; es decir, en la intersección entre la zona inoculada con la torunda y la zona inoculada inicialmente con el asa.

Incubar las placas inoculadas a una temperatura de 35 ± 2 °C en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono. Si las placas se incuban sin dióxido de carbono, las zonas beta-hemolíticas y el tamaño de las colonias serán más pequeños y se observarán menos colonias.

Examinar las placas después de 18 – 24 h.

Control de calidad del usuario
Véase "Procedimientos de control de calidad".

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de CLSI y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

X RESULTADOS

Después de 18 – 24 h de incubación en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono, los estreptococos del grupo A (*S. pyogenes*) en el medio **ssA** tendrán un aspecto de colonias translúcidas u opacas, de color blanco a gris, pequeñas (1 a 2 mm) rodeadas de una zona de beta-hemólisis. Es habitual observar una reducción de tamaño, en comparación con el control no selectivo, el agar de soja **Trypticase** con sangre de carnero al 5%. Colonias muy diminutas o pequeñas de estreptococos alfa-hemolíticos, no hemolíticos u otros beta-hemolíticos pueden crecer en pequeñas cantidades, pero no interferirán con la recuperación de los estreptococos del grupo A ni con la interpretación de los resultados. Las especies *Neisseria*, los estreptococos del grupo viridans, los estafilococos, los bacilos gram negativos y la mayoría de los estreptococos beta-hemolíticos diferentes de los grupos A y B son inhibidos en el medio **ssA**. La sensibilidad a la bacitracina puede ser utilizada para diferenciar los estreptococos del grupo A de los del grupo B. El crecimiento de regular a denso de colonias

beta-hemolíticas que demuestran una zona de inhibición alrededor del disco **Taxo** A puede informarse presuntivamente como *S. pyogenes*. También puede realizarse una prueba de PYR (ácido piroglutámico). Es más específica e igual de sensible que la prueba de bacitracina para dicho propósito[7]. Se deben producir y examinar cepas Gram.

Se puede llevar a cabo un procedimiento de prueba para la determinación de grupo serológico si hay presentes suficientes colonias beta-hemolíticas bien aisladas.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Dado que no existe un medio perfecto, es posible encontrar algunas cepas de estreptococos del grupo A (*S. pyogenes*) que crecerán muy poco en este medio; la naturaleza de las muestras y el estado fisiológico de los organismos pueden influenciar la recuperación de las especies deseadas, además de modificar los efectos de las características de inhibición del medio. Por tanto, es útil comparar el crecimiento de ambos lados de la biplaca para obtener información adicional y asegurar la recuperación óptima de los patógenos potenciales.

Este medio preparado en placa está diseñado para aislamientos primarios. Algunas pruebas diagnósticas pueden realizarse con la placa primaria. Sin embargo, se recomienda un cultivo puro para realizar las pruebas bioquímicas y los procedimientos serológicos. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados[6-8].

XII CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

En una evaluación clínica de 460 cultivos faríngeos, se registró un total de 117 muestras con resultado positivo a estreptococos del grupo A en Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**), en comparación con 100 en SXT Sheep Blood Agar y 84 en **Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II). De dichos cultivos positivos, 103 fueron identificados según la sensibilidad a beta-hemólisis y bacitracina (0,04 de unidad) a las 24 h en **ssA** en comparación con 80 en SXT y sólo 32 en el control de agar sangre TSA no selectivo[9].

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
221783	**BBL** Group A Selective Strep Agar with 5% Sheep Blood (**ssA**) // **BBL Trypticase** Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II), pqt. de 20 biplacas

XIV REFERENCIAS

1. Evans, G.L., and T.E. O'Neill. 1984. Development of an improved selective medium for the isolation of group A streptococci from throat cultures, abstr. C-136, p. 259. Abstr. 84th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1984.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
3. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. *17*:53-80.
4. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
5. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
6. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
7. Ruoff, K.L., R.A. Whiley, and D. Beighton. 1999. *Streptococcus*, p. 283-296. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
8. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn, Jr. 1997. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia.
9. Carlson, J.R., W.G. Merz, B.E. Hansen, S. Ruth, and D.G. Moore. 1985. Improved recovery of group A beta-hemolytic streptococci with a new selective medium. J. Clin. Microbiol. *21*:307-309.

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663

EC REP
BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection. BD, BD Logo, BBL, CultureSwab, ssA, Taxo and Trypticase are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2006 BD