

**PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD (Opcionales)**

**I INTRODUCCION**

**BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood** (agar **BD BBL Columbia** con sangre de carnero al 5%) es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento y diferenciación de microorganismos gram positivos a partir de muestras clínicas y no clínicas.

**BD BBL MacConkey II Agar** (agar **BD BBL MacConkey II**) es un medio selectivo y de diferenciación para la detección de organismos coliformes y patógenos entéricos.

**II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS**

**A. BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood**

1. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
  - a. A cada placa añadir 0,1 mL de una dilución de un cultivo de caldo de 18–24 h con un contenido calculado de  $10^3$ – $10^4$  UFC/0,1 mL de las cepas *Streptococcus* y *Staphylococcus* y  $10^4$ – $10^5$  UFC/0,1 mL de la cepa *Proteus*. Extender el inóculo con un esparcidor de vidrio estéril.
  - b. Incubar las placas a  $35 \pm 2$  °C en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono.
  - c. Incluir placas de agar de soja **BD Trypticase** con sangre de carnero al 5% (TSA II) como controles no selectivos para todos los organismos.
2. Examinar las placas después de 18–24 h para determinar crecimiento, tamaño de las colonias, reacciones hemolíticas, pigmentación y selectividad.
3. Resultados previstos

<b>Organismos de control CLSI</b>	<b>ATCC</b>	<b>Resultado</b>
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Crecimiento, beta-hemólisis
* <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Crecimiento, alfa-hemólisis
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Crecimiento
* <i>Proteus mirabilis</i>	12453	Inhibición (parcial a completa)

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

**B. BD BBL MacConkey II Agar**

1. Inocular muestras representativas con diluciones de los cultivos enumerados a continuación.
  - a. Extender en las placas para aislamiento un cultivo de caldo de 18–24 h de *Enterococcus faecalis* diluido a  $10^4$  para obtener  $10^5$  UFC/placa. Para el resto de los organismos, utilizar un cultivo de caldo de 18–24 h diluido a  $10^3$  para obtener  $10^4$  UFC/placa.
  - b. Incubar los tubos a  $35 \pm 2$  °C en una atmósfera aerobia.
  - c. Incluir placas de TSA II como controles no selectivos para todos los organismos.
2. Examinar las placas después de 18–24 h para determinar crecimiento, tamaño de las colonias, pigmentación y selectividad.
3. Resultados previstos

<b>Organismos de control CLSI</b>	<b>ATCC</b>	<b>Resultado</b>	<b>Color de las colonias</b>
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Crecimiento	Color rosa
* <i>Proteus mirabilis</i>	12453	Crecimiento, inhibición (parcial) de proliferación	Incoloras
* <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	14028	Crecimiento	Incoloras
* <i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Inhibición (parcial)	
<b>Additional Organisms</b>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	Crecimiento	Color de rosa a verde
<i>Shigella dysenteriae</i>	9361	Crecimiento	Incoloras a color rosa

\*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  $7,3 \pm 0,2$  (**BD BBL Columbia CNA With 5% Sheep Blood**) y  $7,1 \pm 0,2$  (**BD BBL MacConkey II Agar**).
4. Observar la firmeza de las placas durante el procedimiento de inoculación.
5. Incubar las placas representativas no inoculadas a  $35 \pm 2$  °C durante 72 h y examinar se presentan contaminación microbiana.

**INFORMACION DEL PRODUCTO**

**IV USO PREVISTO**

**BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood** es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento y diferenciación de microorganismos gram positivos a partir de muestras clínicas y no clínicas.

**BD BBL MacConkey II Agar** es un medio selectivo y de diferenciación para la detección de organismos coliformes y patógenos entéricos.

## V RESUMEN Y EXPLICACION

### A. BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood

En 1966, Ellner et al reseñaron el desarrollo de una fórmula de agar sangre, designada como agar Columbia<sup>1</sup>. La base de agar Columbia, que logra un crecimiento rápido y abundante, además de reacciones hemolíticas claramente definidas, se utiliza como la base de los medios con sangre y para las fórmulas selectivas en las que se utilizan diversas combinaciones de agentes antimicrobianos como aditivos.

Ellner y sus colegas descubrieron que un medio formado por 10 mg de colistina y 15 mg de ácido nalidíxico por litro en una base de agar Columbia enriquecido con sangre de carnero al 5% favorecería el crecimiento de estafilococos, estreptococos hemolíticos y enterococos, a la vez que inhibiría el crecimiento de las especies *Proteus*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*. En **BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood**, la concentración de ácido nalidíxico se ha reducido a 10 mg/L para aumentar la recuperación de cocos gram positivos a partir de muestras clínicas.

### B. BD BBL MacConkey II Agar

En la actualidad, varios medios de cultivo se encuentran disponibles para los trabajadores de laboratorio para el aislamiento, cultivo e identificación de bacterias entéricas. Uno de los primeros fue desarrollado por MacConkey y se publicó su primera descripción en forma de una breve nota<sup>2</sup>. La publicación de referencia acerca del agar MacConkey es de 1905 y contenía descripciones detalladas del medio y los patrones de crecimiento bacteriano obtenidos<sup>3</sup>. Esta fórmula fue diseñada basándose en el conocimiento de que los ácidos causan la precipitación de las sales biliares y determinados microorganismos entéricos fermentan la lactosa, mientras que otros no presentan esta capacidad.

Desde las primeras publicaciones, la fórmula del agar MacConkey se ha modificado varias veces. Una compilación de medios de cultivo publicada en 1930 enumera diez modificaciones publicadas hasta ese momento<sup>4</sup>. Entre las modificaciones más recientes se incluye el uso de aditivos (por ej., kanamicina<sup>5</sup>) y la eliminación de determinados elementos (por ej., violeta cristal<sup>6</sup> y rojo neutro<sup>7</sup>).

Un agar MacConkey modificado (agar MCIC) es uno de los medios de cultivo recomendados por la American Public Health Association para uso en el examen de agua marina y mariscos<sup>8</sup>. El agar MacConkey también se utiliza en el análisis microbiológico de alimentos<sup>9</sup>. Está recomendado para uso con muestras clínicas con flora microbiana mixta probable, tal como la orina, las vías respiratorias y heridas, porque permite un agrupamiento preliminar de bacterias gram negativas entéricas y de otra clase<sup>10</sup>.

La fórmula de **BD BBL MacConkey II Agar** se hizo disponible en 1983. Fue especialmente diseñada para mejorar la inhibición de la especie *Proteus* con agrupamiento dinámico, con el fin de lograr una diferenciación más definitiva de los organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa, además de favorecer un crecimiento superior de patógenos entéricos.

## VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

### A. BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood

Las propiedades superiores del **BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood** para propiciar el crecimiento se derivan de la combinación de peptonas preparadas de digerido pancreático de caseína, digerido péptico de tejido animal y extracto de carne bovina. También se incluyen extracto de levadura y almidón de maíz en la fórmula y sirven como fuentes de energía. El extracto de levadura suministra vitaminas del complejo B.

La sangre de carnero permite la detección de reacciones hemolíticas y suministra el factor X (hemo) necesario para el crecimiento de varias especies bacterianas, pero no posee el factor V (nicotinamida adenina dinucleótido, NAD), dado que contiene NADasa (nicotinamida adenina dinucleotidasa), que destruye el NAD. Debe tenerse en cuenta que este medio tiene un contenido de carbohidratos relativamente alto y, por consiguiente, los estreptococos beta-hemolíticos pueden producir una reacción hemolítica de color verdoso que puede confundirse con alfa-hemólisis.

La adición de agentes antimicrobianos, colistina y ácido nalidíxico, hace al medio selectivo para microorganismos gram positivos. La colistina afecta las membranas celulares de organismos gram negativos, mientras que el ácido nalidíxico bloquea la reproducción de ADN en bacteria gram negativas sensibles<sup>11</sup>.

### B. BD BBL MacConkey II Agar

**BD BBL MacConkey II Agar** es un medio selectivo y de diferenciación. Es selectivo sólo ligeramente dado que la concentración de las sales biliares, que inhiben los microorganismos gram positivos, es baja en comparación con otros medios en placa entéricos.

También se incluye cristal violeta en el medio para inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas, en especial los enterococos y estafilococos.

La diferenciación de microorganismos entéricos se logra mediante la combinación de lactosa y el indicador rojo neutro. Se producen colonias de incoloras a color rosa/rojo según la capacidad del aislado de fermentar los carbohidratos.

## VII REACTIVOS

### BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood

Fórmula aproximada\* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de caseína.....	12,0 g	Cloruro sódico.....	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal.....	5,0 g	Agar.....	13,5 g
Extracto de levadura.....	3,0 g	Colistina.....	10,0 mg
Extracto de carne bovina.....	3,0 g	Ácido nalidíxico.....	10,0 mg
Almidón de maíz.....	1,0 g	Sangre de carnero, desfibrinada.....	5 %

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

### BD BBL MacConkey II Agar

Fórmula aproximada\* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de gelatina.....	17,0 g	Cloruro sódico.....	5,0 g
Digerido pancreático de caseína.....	1,5 g	Rojo neutro.....	0,03 g
Digerido péptico de tejido animal.....	1,5 g	Cristal violeta.....	0,001 g
Lactosa.....	10,0 g	Agar.....	13,5 g
Sales biliares.....	1,5 g		

\* 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"<sup>12-15</sup> y las directrices del centro. Después de ser usados, los recipientes de muestras 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, si se encuentran almacenadas en su envase original a una temperatura de 2–8 °C hasta el momento de utilizarse, pueden inocularse hasta la fecha de caducidad e incubarse según los tiempos de incubación recomendados. Dejar que el medio alcance temperatura ambiente antes de realizar 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

Se han diseñado diversos recipientes y torundas para recolectar las muestras. Las muestras deben obtenerse antes de administrar el tratamiento antimicrobiano. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio. Se han diseñado varios medios de conservación y transporte, tales como los productos de recogida y transporte de muestras **BD BBL**, con el fin de prolongar la supervivencia de los microorganismos cuando se prevé una demora significativa entre el momento de recogida y el cultivo definitivo.

Consultar los textos correspondientes para conocer los detalles relativos a los procedimientos de recogida y manipulación de muestras<sup>16,17</sup>.

El laboratorio debe disponer de suficiente información clínica para permitir al especialista en microbiología seleccionar los medios más adecuados y las técnicas apropiadas.

## IX PROCEDIMIENTO

**Material suministrado:** **BD BBL** Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood y **BD BBL** MacConkey II Agar (**BD I 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:** Emplear técnicas asépticas.

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

Extender la muestra tan pronto como sea posible después de recibirla en el laboratorio. La placa de extendido se emplea sobre todo para aislar cultivos puros en muestras que contengan flora microbiana 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.

Incubar las placas, protegidas de la luz, a 35 ± 2 °C durante 18–24 h. Incubar las muestras respiratorias en atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono. Incubar las otras muestras en atmósfera aerobia sin añadir CO<sub>2</sub>.

**Control de calidad del usuario:**

Cada lote de medios se ha probado con los microorganismos de control de calidad adecuados mediante una prueba que cumple las especificaciones del producto y los criterios aplicables del CLSI. Como siempre, las pruebas de control de calidad se deben llevar a cabo conforme a la normativa local, estatal, federal o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y/o a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio.

## X RESULTADOS

Después de la incubación aparecerá en la mayoría de las placas una sección donde confluye el crecimiento. El procedimiento de frotis es de hecho una técnica de dilución, por lo que se depositarán cada vez menos microorganismos en las áreas en que se realiza. Por esto, una o más de estas áreas presentarán colonias aisladas de los microorganismos que contiene la muestra. Se obtiene un mejor aislamiento debido al efecto inhibidor de los medios.

A continuación se detalla la morfología característica de las colonias en **BD BBL** Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood:

Estreptococos (diferentes del grupo D)..... Pequeños, de color de blanco a gris Beta- o alfa-hemólisis.

Enterococos (grupo D) ..... Estreptococos pequeños, pero más grandes que los del grupo A, de color azul gris. Beta- o alfa-hemólisis.

Estafilococos ..... Grandes, de color de blanco a gris o crema a amarillo, con o sin hemólisis

Micrococos ..... Grandes, de color de blanco a gris o amarillo a anaranjado, con o sin hemólisis

Corinebacterias ..... De pequeños a grandes, de color de blanco a gris o amarillo con o sin hemólisis

*Candida* ..... Pequeños, de color blanco

*Listeria monocytogenes* ..... De pequeños a grandes, de color azul gris, con beta-hemólisis

Bacterias gram negativas ..... Sin crecimiento a crecimiento de traza

A continuación se detalla la morfología característica de colonias en **BD BBL** MacConkey II agar:

*E. coli* ..... De color de rosa a rojo carmesí (posiblemente rodeados de una zona de precipitación de bilis)

*Enterobacter/Klebsiella* ..... Mucoide, de color rosa

*Proteus* ..... Incoloros, inhibición de agrupamiento dinámico en áreas con colonias aisladas

*Salmonella* ..... Incoloros

*Shigella* ..... Incoloros

*Pseudomonas* ..... Con forma irregular, de incoloros a color rosa

Bacterias gram positivas ..... Sin crecimiento a crecimiento leve

## XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se ha descrito que algunas *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* son inhibidas en agar MacConkey cuando se incuban en una atmósfera de CO<sub>2</sub><sup>18</sup>.

No todas las cepas de *E. coli* fermentan la lactosa.

Es posible realizar algunas pruebas de diagnóstico con la placa primaria. No obstante, se recomienda obtener un cultivo puro para las pruebas bioquímicas y otros procedimientos de identificación. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados<sup>19-23</sup>.

Un solo medio es rara vez es adecuado para detectar todos los organismos de importancia posible en una muestra. Se debe tener en cuenta que los organismos por lo general sensibles al agente antimicrobiano en un medio selectivo pueden ser inhibidos por completo o sólo parcialmente, según la concentración del agente, las características de la cepa microbiana y el número de organismos en el inóculo. No deben inhibirse los organismos generalmente resistentes al agente antimicrobiano. Los cultivos de muestras cultivadas en medios selectivos, por consiguiente, deben compararse con muestras cultivadas en medios no selectivos para obtener información adicional y favorecer el aislamiento de patógenos potenciales.

## XII CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de **BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood** se analizan para determinar sus características de rendimiento. Se inoculan mediante extensión muestras representativas del lote con 0,1 mL de los siguientes cultivos: *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6305) y *S. pyogenes* (ATCC 19615). Los inóculos de *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* se diluyen hasta obtener una concentración de 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> UFC (unidades formadoras de colonias) por 0,1 mL; el inóculo para *P. mirabilis* se diluye hasta obtener una concentración de 10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> UFC/0,1 mL. Después de la inoculación, las placas se inoculan a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono. Después de 18–24 h de incubación, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* muestran crecimiento de medio a denso, con morfología de colonias característica, pigmentación y reacciones hemolíticas, mientras que *P. mirabilis* muestra crecimiento de nulo a medio sin agrupamiento dinámico de colonias.

### BD BBL MacConkey II Agar

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de agares **BD BBL MacConkey II Agar** se analizan para determinar sus características de rendimiento. Se inoculan muestras representativas del lote con los siguientes cultivos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 12453), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Shigella dysenteriae* (ATCC 9361) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). El inóculo para *E. faecalis* se diluye hasta obtener una concentración de 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> UFC (unidades formadoras de colonias) por placa; los inóculos para todos los demás organismos se diluyen hasta obtener una concentración de 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> UFC/placa. Después de la inoculación, las placas se inoculan a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia. Después de 18–24 h de incubación, las colonias de *E. coli* son de color rojo carmesí y pueden estar rodeadas por precipitación de bilis; *P. mirabilis* muestra crecimiento de medio a denso de colonias incoloras e inhibición del agrupamiento dinámico de colonias; *P. aeruginosa* muestra zonas de crecimiento confluyente que pueden presentar una pigmentación de verde a amarillo/verde, mientras que las colonias individuales muestran pigmentación rosa a verde; *Salmonella* Typhimurium muestra crecimiento medio a denso de colonias incoloras; *S. dysenteriae* muestra crecimiento de colonias de transparentes a rosas; *E. faecalis* se encuentra inhibido por completo o parcialmente (crecimiento medio) y las colonias pueden ser de color rosa.

## XIII DISPONIBILIDAD

### Nº de cat. Descripción

221600	<b>BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood</b> y <b>BD BBL MacConkey II Agar BD I Plate</b> , pqt. de 20 placas €
221601	<b>BD BBL Columbia CNA Agar with 5% Sheep Blood</b> y <b>BD BBL MacConkey II Agar BD I Plate</b> , caja de 100 placas

#### XIV REFERENCIAS

1. Ellner, P.D., C.J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:502–504.
2. MacConkey, A.T. 1900. Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli communis* and the *Bacillus typhi abdominalis*. *The Lancet*, Part II:20.
3. MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. *J. Hyg.* 5:333–379.
4. Levine, M., and H.W. Schoenlein. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
5. Andersen, R.L., D.R. Graham, and R.E. Dixon. 1981. Rapid presumptive identification of *Citrobacter diversus* as an aid in controlling infections. *J. Clin. Microbiol.* 74:161–164.
6. World Health Organization. 1963. International standards for drinking waters, 7th ed. Churchill Ltd. London.
7. Walters, E.W., M.L. Cooper, and H.M. Keler. 1954. The detection microscopically of colonies of *Shigella* in stool cultures. *J. Bacteriol.* 67:247–251.
8. Greenberg, A.E., and D.A. Hunt (ed.). 1985. Laboratory procedures for the examination of seawater and shellfish, 5th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
9. Downes and Ito (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
10. Farmer, J.J., III. 1999. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 442–458. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Estevez, E.G. 1984. Bacteriologic plate media: review of mechanisms of action. *Lab. Med.* 15:258–262.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Isenberg, H.D., F.D. Schoenknecht, and A. von Graevenitz. 1979. Cumitech 9, Collection and processing of bacteriological specimens. Coordinating ed., S.J. Rubin. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
17. Miller, J.M. and H.T. Holmes. 1999. Specimen collection, transport, and storage, p.33–63. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
18. Mazura-Reetz, G., T.R. Neblett, and J.M. Galperin. 1979. MacConkey agar: CO<sub>2</sub> vs. ambient incubation, abstr. C179, p. 339. *Abstr. 79th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 1979.
19. 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 Company, Philadelphia.
20. MacFaddin, J.F. 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
21. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
22. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Tenover, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.) 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
23. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite [www.bd.com](http://www.bd.com).



 Becton, Dickinson and Company  
7 Loveton Circle  
Sparks, MD 21152 USA

 Benex Limited  
Pottery Road, Dun Laoghaire  
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

© 2017 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.