

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (agar de soja **BD BBL Trypticase** con sangre de carnero al 5%) se utiliza para el crecimiento de organismos exigentes y para la visualización de reacciones hemolíticas. **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** (agar **BD BBL MacConkey II** con MUG) se utiliza para la identificación presuntiva de *Escherichia coli*.

II REALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

A. **BD BBL 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 0,1 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 las cepas de *Staphylococcus* y *Escherichia* a 35 ± 2 °C en una 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	Recuperación
* <i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	Crecimiento, beta-hemólisis
* <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Crecimiento, alfa-hemólisis
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Crecimiento
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Crecimiento

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

B. **BD BBL MacConkey II Agar with MUG**

1. Inocular muestras representativas con diluciones de los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Extender en las placas de aislamiento cultivos de caldo de 18–24 h diluidos a 10^{-1} . Para *Proteus mirabilis*, hacer dos diluciones de 10^{-1} adicionales antes de extender la muestra.
 - b. Incubar las placas a una temperatura de 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia.
 - c. Incluir las placas de **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** como controles no selectivos para todos los organismos.
2. Examinar las placas después de 18–48 h para observar la extensión del crecimiento, la fluorescencia, la pigmentación y la selectividad.
3. Resultados previstos

Organismos	ATCC	Recuperación	Color de las colonias	Fluorescencia
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Crecimiento	Colonias de color rojo rosado	+
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Crecimiento	Colonias incoloras, proliferación inhibida	–
* <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serotipo Typhimurium	14028	Crecimiento	Colonias incoloras	–
* <i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Inhibición (parcial o completa)	N/A	–

*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 $7,4 \pm 0,2$ (TSA II) y $7,1 \pm 0,2$ (**BD BBL MacConkey II Agar with MUG**).
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.

INFORMACIÓN DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood se utiliza para el cultivo de microorganismos exigentes y para la visualización de reacciones hemolíticas producidas por varias especies bacterianas.

BD BBL MacConkey II Agar with MUG se utiliza para la identificación presuntiva de *Escherichia coli*.

V RESUMEN Y EXPLICACIÓN

A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

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

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

La fórmula de **BD BBL MacConkey II Agar** se utiliza desde 1983. Fue diseñada especialmente para mejorar la inhibición de la proliferación de la especie *Proteus* con el fin de lograr una diferenciación más concluyente de los organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa, y para favorecer un crecimiento superior de los patógenos entéricos.

Trepeta y Edberg¹ modificaron el agar MacConkey mediante la incorporación de MUG (4-metilumbeliferil-β-D-glucuronido). El medio resultante permitió a los autores identificar presuntamente *E. coli* en un medio de placa primaria a los 5 min.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

A. BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

La combinación de caseína y peptonas de soja en la base de agar de soja **BD Trypticase** hace que el medio sea altamente nutritivo, al suministrar nitrógeno orgánico, en particular aminoácidos y péptidos de cadena más larga. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico.

La sangre de carnero desfibrinada es la sangre más ampliamente utilizada para enriquecer los medios de base de agar². Las reacciones hemolíticas de los estreptococos son adecuadas y se inhibe el crecimiento de *Haemophilus haemolyticus*, un organismo no patógeno cuyas colonias hemolíticas no son distinguibles de las de estreptococos beta-hemolíticos.

BD BBL 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 (**BD Taxo A**) con una concentración baja (0,04 unidad) para la identificación presuntiva de los estreptococos del grupo A (*S. pyogenes*).

B. BD BBL MacConkey II Agar with MUG

BD BBL MacConkey II Agar es un medio selectivo y de diferenciación. Es selectivo sólo ligeramente puesto que la concentración de 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 incoloras o de color de rosa a rojo según la capacidad del aislado para fermentar los carbohidratos.

La mayoría de las cepas (96–97%) de *E. coli* produce una enzima, β-D-glucuronidasa³, que hidroliza MUG para producir 4-metilumbeliferona, un compuesto que produce fluorescencia bajo luz UV de longitud de onda larga (366 nm). Al añadir MUG a la fórmula, las cepas de *E. coli* positivas a la β-D-glucuronidasa pueden producir fluorescencia de color azul verdoso cuando son examinadas bajo luz UV.

VII REACTIVOS

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

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

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

BD BBL MacConkey II Agar with MUG

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	MUG (4-Metilumbeliferil-(β-D-glucuronidato))	0,1 g
Sales biliares	1,5 g	Agar	13,5 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"⁴⁻⁷ 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 a 8 °C hasta el momento de su utilización, pueden inocularse hasta la fecha de caducidad e incubarse durante los tiempos 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 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras adecuadas para cultivo deben manipularse mediante diversas técnicas. Para obtener información detallada, consultar los textos correspondientes^{8,9}. Las muestras deben obtenerse antes de administrar los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II) y **BD BBL MacConkey II Agar with MUG (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 del agar debe estar lisa y húmeda, pero sin humedad en exceso.

Extender las muestras tan pronto como sea posible después de recibir las 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.

Incubar las placas, protegidas de la luz, a una temperatura de 35 ± 2 °C durante un período de 18–24 h. Incubar las muestras respiratorias en atmósfera aerobia suplementada con dióxido de carbono. Con respecto a las otras muestras, incubarlas en atmósfera aerobia *sin* añadir CO₂.

Control de calidad del usuario

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional aplicable, 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 la incubación aparecerá en la mayoría de las placas una sección donde confluye el crecimiento. Dado que el procedimiento de extensión de la muestra es una técnica de "dilución", se depositan cada vez menos microorganismos en las áreas extendidas. Por consiguiente, una o más de estas áreas presentarán colonias aisladas de los organismos que contenga la muestra. Por otra parte, el crecimiento de cada organismo podrá medirse semi-cuantitativamente basándose en el crecimiento ocurrido dentro de las áreas en donde se extienden las muestras.

A continuación se detallan los resultados característicos de **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood**:

1. Los estreptococos hemolíticos pueden tener un aspecto translúcido u opaco, de color grisáceo, de tamaño pequeño (1 mm), o bien ser colonias grandes (2–4 mm), de color mate y mucoides, rodeadas de una zona de hemólisis. Se deben realizar tinciones de Gram y examinarse para comprobar los resultados detectados a simple vista. (Otros organismos que pueden causar hemólisis son *Listeria*, diversas corinebacterias, estafilococos hemolíticos, *Escherichia coli* y *Pseudomonas*).
Al notificar los resultados, puede ser útil para el clínico obtener una cuantificación aproximada del número de colonias de estreptococos hemolíticos.
2. Los neumococos por lo general tienen aspecto de colonias muy planas, lisas, translúcidas, grisáceas y a veces mucoides, rodeadas de una zona angosta de (alfa)-hemólisis "de color verde".
3. Los estafilococos tienen un aspecto de colonias opacas, de blanco a amarillo dorado, con o sin zonas de beta-hemólisis.
4. *Listeria*. Se producen zonas pequeñas de beta-hemólisis. En las tinciones se las puede distinguir por su forma de bacilo y por la movilidad que presentan a temperatura ambiente.
5. También se puede esperar el crecimiento de otros organismos que representan una flora mínima y aislados clínicamente significativos en esta fórmula no selectiva.

La morfología característica de las colonias en **BD BBL MacConkey II Agar with MUG** es la siguiente:

Las colonias de las bacterias fermentadoras de lactosa presentan un color de rosa a rojo rosado y pueden estar rodeadas por una zona de precipitación de bilis, mientras que las colonias no fermentadoras de lactosa son incoloras. Examinar el medio bajo luz UV de longitud de onda larga (366 nm). Las colonias positivas a β -D-glucuronidasa presentan fluorescencia de color azul verdoso; las colonias negativas a la β -D-glucuronidasa no presentan fluorescencia.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se ha descrito la inhibición de algunas *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* en agar **BD BBL MacConkey** cuando se incuban en una atmósfera enriquecida con CO₂¹⁰.

No todas las cepas de *E. coli* fermentan la lactosa ni producen β -D-glucuronidasa. Algunas cepas de *Salmonella* y *Shigella* producen β -D-glucuronidasa y presentarán fluorescencia¹¹. Se ha reseñado la fluorescencia de un pequeño porcentaje de *Yersinia* y estreptococos¹².

Con fines de identificación, los organismos deben encontrarse en cultivo puro. Deben llevarse a cabo pruebas morfológicas, bioquímicas y/o serológicas para lograr una identificación final. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados^{8,9,13}.

XII CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood

BD BBL Trypticase Soy Agar (TSA) with 5% Sheep Blood fue utilizado como control en un estudio en el que se utilizó cultivo mejorado de caldo (Todd Hewitt) y el método de inmunoensayo óptico para el diagnóstico de la infección estreptocócica b-hemolítica. Se analizaron 502 muestras. TSA with 5% Sheep Blood presentó una sensibilidad y especificidad del 92,5% y 99,4%, respectivamente¹⁴. Nguyen et al utilizaron **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** como el patrón de referencia para la detección de *Streptococcus* del grupo B a partir de muestras de las vías genitales inferiores de mujeres embarazadas¹⁵. En otro estudio, Rossmann et al volvieron a aislar satisfactoriamente *Lautropia mirabilis* en **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** a partir de las muestras de cavidades bucales de niños infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana¹⁶. De los 85 niños evaluados en este estudio, 35 (41,4%) dieron resultado positivo de *L. mirabilis*. Isenberg et al utilizaron **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood** como un control para evaluar la recuperación de *Enterococcus* a partir de un medio selectivo en estudio¹⁷. Se utilizaron 250 cepas de estreptococos del grupo D aisladas de muestras clínicas y 8 cepas obtenidas del National Communicable Disease Center (Atlanta, GA, EE.UU.).

BD BBL MacConkey II Agar with MUG

En un estudio clínico realizado en un hospital y en una facultad de medicina, MUG fue incorporado en **BD BBL MacConkey II Agar** para detectar la presencia de β -glucuronidase-glucuronidasa. Se descubrió que se redujo el tiempo de identificación de la cepas de *E. coli* de una hora a cinco minutos y se mejoró la capacidad de identificar este organismo en muestras mixtas¹.

XIII DISPONIBILIDAD

Nº de cat. Descripción

221949 **BD BBL Trypticase Soy Agar with 5% Sheep Blood (TSA II)** y **BD BBL MacConkey II Agar with MUG-BD I Plate**

XIV REFERENCIAS

1. Trepeta, R.W., and S.C. Edberg. 1984. Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 19:172-174.
2. Vera, H.D., and D.A. Power. 1980. Culture media, p. 969. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler, Jr., and J.P. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. Killian, M., and P. Bulow. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*. I Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B*, 84:245-251.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover (ed.). 2003. *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
10. Mazura-Reetz, G., T.R. Neblett, and J.M. Galperin. 1979. MacConkey agar: CO₂ vs. ambient incubation, abstr. C 179, p. 339. *Abstr. 79th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 1979.
11. Feng, P.C.S., and P.A. Hartmen. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1320-1329.
12. Robison, B.J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:285-288
13. 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.
14. Fries, S.M. 1995. Diagnosis of group A streptococcal pharyngitis in a private clinic: comparative evaluation of an optical immunoassay method and culture. *J. Pediatr.* 126:933-936.
15. Nguyen, T.M., et al. 1998. Detection of group B streptococcus: comparison of an optical immunoassay with direct plating and broth-enhanced culture methods. *J. Matern. Fetal. Med.* 7:172-176.
16. Rossmann, S.N. et al. 1998. Isolation of *Lautropia mirabilis* from oral cavities of human immunodeficiency virus-infected children. *J. Clin. Microbiol.* 36:1756-1760.
17. Isenberg, H.D., D. Goldberg, and J. Sampson, 1970. Laboratory studies with a selective medium. *Appl. Microbiol.* 20: 433-436.

Servicio técnico: póngase en contacto con el representante local de BD o visite 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.