

INSTRUCCIONES GENERALES DE USO

Medios listos para usar y completados parcialmente

En este documento se ofrece información acerca de la estructura de los documentos de **Instrucciones de uso**, así como información adicional relativa al uso de los medios **BD** listos para usar y completados parcialmente.

En los recuadros de texto se presenta información adicional no suministrada en los documentos individuales de Instrucciones de uso.

El **encabezamiento** de la página 1 de todos los documentos contiene el **marcado CE**, si el producto es un **IVD**, según la Directiva europea sobre productos sanitarios de diagnóstico *in vitro*¹. Asimismo, se detallan el **número y versión del documento** (por ej., **PA-123456.01** para medios en placa y **BA-123456.01** para medios en frasco) y la **fecha de revisión** (mes y año). El número y la versión del documento se repiten en el **pie** de cada página.

A continuación, se detalla el **nombre del producto**. Algunos documentos de **Instrucciones de uso** contienen las descripciones de varios medios con fórmulas y aplicaciones similares.

USO PREVISTO

Se indica el área de aplicación. Si se utiliza para otras aplicaciones, el medio o el procedimiento deben ser validados por el usuario.

BD Diagnostic Systems no se hace responsable de la utilización del producto para aplicaciones, microorganismos o procedimientos no recomendados en las **Instrucciones de uso**.

PRINCIPIOS Y EXPLICACION DEL PROCEDIMIENTO

En esta sección, se indica el principio del método ("Método microbiológico"). Además, se ofrece información acerca de la historia y el desarrollo del medio, los principios del procedimiento y la función de los ingredientes enumerados en la sección **REACTIVOS**.

REACTIVOS

Esta sección contiene la fórmula y el pH del producto.

En la Tabla de fórmulas, las cantidades de los ingredientes [g, mg, µg, mL, IU, U, etc] se mencionan sólo una vez y de allí en adelante sólo si se modifican. Se proporciona un **ejemplo a continuación**:

BD CHROMagar O157

Fórmula* por litro de agua purificada

Cromopeptona	22,0 g	
Cloruro sódico	5,0	← cantidad en [g]
Telurito potásico	2,5 mg	
Cefixima	0,05	← cantidad en [mg]
Cefsulodina	4,0	← cantidad en [mg]
Mezcla selectiva y cromógena especial	1,0 g	
Agar	12,0	← cantidad en [g]

pH: 7,1 ± 0,2

PRECAUCIONES

Si tienen la etiqueta **IVD**, los medios **BD** listos para usar o completados parcialmente son para uso diagnóstico *in vitro*, como se define en la Directiva europea sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*¹. También se pueden utilizar en otros campos de la microbiología, según se indique para el producto respectivo.

Estos productos son para uso profesional exclusivamente y deben ser utilizados sólo por personal capacitado o cualificado. No deben ser utilizados para análisis autoadministrados por los pacientes.

Los productos que tienen la etiqueta “Para uso en laboratorio” son para uso en microbiología industrial o general, biotecnología o higiene general solamente, y no deben ser utilizados para procesar muestras clínicas humanas.

No utilizar el producto si muestra evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, grietas o cualquier otro signo de deterioro.

Emplear técnicas asépticas para manipular las muestras y el producto antes, durante y después del uso.

Seguridad biológica y química del producto

Esta sección también puede incluir información acerca de peligros biológicos y/o químicos específicos, indicados por los símbolos correspondientes, junto con las frases R (riesgo) y S (seguridad)².

Con respecto a los riesgos que se originan en el material animal utilizado, **BD** ha decidido obtener dichos materiales principalmente de Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos. En ninguno de estos países se han notificado casos de EEB (encefalopatía espongiforme bovina) en el ganado local. **BD** obtiene los materiales de origen animal en otros países también (por ej., Argentina, Brasil, Colombia, México, Sudáfrica y Uruguay). En ninguno de estos otros países se han notificado casos de BBE en el ganado local.

Peligro biológico que se origina en las muestras y los microorganismos cultivados en medios microbiológicos

Respetar las precauciones establecidas contra los peligros microbiológicos. Las muestras y los cultivos de microorganismos deben ser manipulados según las directrices y legislación locales sobre peligros biológicos. Según la Directiva europea 2000/54/EC, la mayoría de los patógenos bacterianos y fúngicos se incluye en el grupo de riesgo 2. El grupo de riesgo 3** se ha creado para incluir a *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC; también denominada STEC = *E. coli* productora de la toxina Shiga), *Shigella dysenteriae* (tipo 1) y muchos otros hongos y bacterias. Además de otros numerosos patógenos bacterianos y fúngicos, todas las especies de *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. ulcerans* y *Histoplasma capsulatum* se incluyen en el grupo de riesgo 3. Para obtener los detalles, consultar el Anexo III de la Directiva 2000/54/EC³. Se puede obtener acceso directo a esta y otras directivas europeas en www.europa.eu/index.htm.

Desecho del producto

Después del uso y antes de su desecho, los recipientes de muestras y todo el material contaminado, incluidos los medios de cultivo utilizados y los recipientes de cultivo contaminados, deben esterilizarse en autoclave durante 20 a 30 min a 121 °C o más (si deben esterilizarse un gran volumen de materiales desechados), o bien incinerarse mediante procedimientos validados.

ALMACENAMIENTO Y VIDA UTIL

Los medios en placa **BD** listos para usar deben almacenarse a una temperatura entre 2 y 8 °C. Los medios en frascos y laminocultivos deben almacenarse a las mismas o diferentes temperaturas de almacenamiento.

La temperatura de almacenamiento se indica tanto en el documento específico **Instrucciones de uso** como en la etiqueta del paquete o caja del producto.

Evitar la congelación y el sobrecalentamiento.

La congelación puede causar el deterioro completo de los geles de agar o precipitación en los medios líquidos. Las temperaturas superiores a la temperatura de almacenamiento indicada pueden causar el deterioro de los ingredientes de los medios. Esto se aplica especialmente a los agentes selectivos, tales como los antimicrobianos. Puede producirse humedad en exceso debido al agua de condensación después de cambios extremos de temperatura subsiguientes (por ej., de 2 °C a 25 °C y nuevamente a 2 °C) en todos los medios sólidos. Los medios en placa con humedad en exceso deben secarse antes de la inoculación, por ej., colocándolos con las tapas abiertas en una incubadora a 30 – 37 °C hasta un máximo de una hora. ¡No deshidratar los medios! El tiempo exacto de exposición depende de la humedad del aire en la incubadora.

También se indica el **almacenamiento del producto con el envase abierto**. El almacenamiento indicado de las pilas abiertas de medios en placa se refiere al almacenamiento refrigerado en un lugar limpio.

El usuario debe evitar la contaminación durante el almacenamiento, por ej., guardando las placas en bolsas de plástico limpias.

Para el almacenamiento de los medios en frasco de unidades de envase abiertas, la vida útil que aparece en la etiqueta del paquete y en los frascos o viales se aplica siempre que no se hayan abierto.

Todos los medios listos para usar o completados parcialmente deben almacenarse en lugar oscuro.

Si se les expone a luz artificial, solar o UV durante un tiempo más prolongado, el rendimiento de todos los medios se puede reducir. Numerosos medios, tales como los medios cromógenos, agar Endo y otros, son especialmente sensibles a la iluminación intensa antes de la incubación y durante ella.

Todos los medios **BD** listos para usar o completados parcialmente pueden utilizarse hasta la fecha de **caducidad** e incubarse durante los tiempos recomendados de incubación.

Por ejemplo, un medio micobacteriano puede inocularse el día en que caduca el producto, e incubarse durante las cuatro o seis semanas siguientes. Evitar la deshidratación del medio durante la incubación.

La fecha de caducidad (símbolo de reloj de arena) está indicada en los recipientes individuales y en la etiqueta del envase. Se utiliza en todos los productos el formato de año-mes-día: por ejemplo, 2004-06-09 significa 9 de junio de 2004.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Los procedimientos de control de calidad indicados en las **Instrucciones de uso** deben ser llevados a cabo por el usuario. Las cepas de prueba allí mencionadas por lo general (pero no siempre) corresponden a las cepas utilizadas en los procedimientos de control de calidad para la prueba de autorización del fabricante, que puede incluir cepas adicionales para solicitud de identificación. Con mayor frecuencia se utilizan las cepas de la American Type Culture Collection (= ATCC; www.atcc.org), pero también se usan cepas de colecciones europeas, por ej., Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (= DSM; www.dsmz.de) o la National Collection of Type Cultures (= NCTC; www.hpacultures.org.uk).

Se debe consultar el **Certificado de análisis** del lote del producto correspondiente que detalla la batería y los resultados de la cepa de prueba real para la autorización del lote.

Los procedimientos para realizar la prueba de rendimiento microbiológico pueden depender del tipo de medio y método utilizados.

Siempre se deben utilizar suspensiones de cepas de prueba recientes, preparadas de cultivos del día anterior en medios líquidos adecuados (por ej., caldo de soja **tríptico** o **Trypticase** para aerobios, y caldo Schaedler con hemina y vitamina K para anaerobios). También pueden utilizarse suspensiones recientes preparadas de cultivos del día anterior en medios en placa. Los tiempos de incubación de los cultivos previos deben prolongarse si la cepa de prueba crece lentamente.

Para **analizar la capacidad nutritiva de un medio en placa** según la norma CLSI M22, diluir la suspensión de inóculo a una concentración de $1 - 2 \times 10^4$ UFC por placa⁴. Debe utilizarse un inóculo diluido a 1:10 si así no se proporcionan colonias aisladas. Según DIN EN 12322, las propiedades de promoción del crecimiento se analizan con 100 – 1000 UFC o una cantidad suficiente de UFC para proporcionar colonias aisladas mediante una técnica apropiada de extensión en placa⁵. Si las cepas se inoculan mediante una técnica cuantitativa en placa, entre 50 y 500 UFC por placa es por lo general la concentración adecuada para obtener un número de colonias de las que se puede realizar un recuento. Siguiendo las directrices de las Farmacopeas Europea y de Estados Unidos, se deben utilizar 10 – 100 UFC por placa (o recipiente)^{6,7}.

Para **analizar la capacidad inhibidora del medio selectivo en placa**, según la norma de CLSI M22, se deben utilizar entre 1 y 2×10^5 UFC por placa para inoculación y alrededor de 10^4 UFC o más conforme a DIN EN 12322^{4,5}. Los inóculos con un alto número de cepas no deseadas pueden “sobrecargar” el medio, lo que puede producir crecimiento de “afloración”. Para fines de comparación, siempre se debe incluir un medio de referencia de crecimiento, que debe ser un medio no selectivo que proporcione crecimiento óptimo de todas las cepas de prueba. Para cepas aerobias, agar Columbia con sangre de carnero al 5%, para cepas exigentes (como *Neisseria gonorrhoeae*) agar Chocolate, para anaerobios, agar Schaedler

con vitamina K y sangre de carnero al 5%, y para hongos, agar glucosa Sabouraud son medio adecuados para este propósito. Si se analiza cuantitativamente, el crecimiento de cepas “deseadas” en el medio de prueba debe ser por lo menos un 70% del registrado en el medio de referencia. En los medios selectivos, el crecimiento de cepas “no deseadas” debe ser inhibido parcial o completamente. El nivel de inhibición depende del medio y las cepas, pero el crecimiento generalmente se reduce en un factor de $10^3 - 10^4$ (o más) en comparación con el crecimiento en el medio de referencia de crecimiento no selectivo.

Para el análisis del **rendimiento del crecimiento de medios en frascos o botellas**, se utilizan métodos comparables. Los tubos y frascos más pequeños se deben inocular con 10^5 UFC según la norma de CLSI M22⁴. Los procedimientos de las Farmacopeas Europea y de Estados Unidos, y DIN EN 12322 requieren de los mismos inóculos antes mencionados para los medios en placa⁵⁻⁷. Los frascos con volúmenes de llenado superiores a 10 mL primero deben dosificarse en alícuotas de 5 o 10 mL en tubos estériles y analizarse de la misma manera.

Incubar y examinar los medios inoculados según se describe para el producto correspondiente.

Determinar el **pH** potenciométricamente a temperatura ambiente (25° C) para determinar el cumplimiento de los valores especificados para el producto. El intervalo del pH presentado en el documento **Instrucciones de uso** es el determinado después de la fabricación del medio. Puede variar un poco durante la vida útil y depender del sistema de electrodos utilizado.

La **esterilidad del producto** puede ser analizada por el usuario mediante la incubación de varias placas (o recipientes, por ej., frascos) a una temperatura adecuada de incubación (por ej., de 28 a 35 °C) durante 5 – 7 días o según lo que corresponda para los procedimientos a seguir^{6,7}.

Los medios líquidos con turbidez natural deben subcultivarse en un medio sólido adecuado (por ej., placas de agar de soja **Trypticase**) después de la incubación para determinar la esterilidad. Asimismo, las tinciones de Gram y la microscopia de los medios pueden ser recursos valiosos en caso de duda.

PROCEDIMIENTO

En **Materiales suministrados**, se indican los medios y el tipo de recipiente. La mayoría de los medios en placa **BD** listos para usar se suministran en placas **BD** Stacker de 90 mm, diseñadas para que calcen entre sí y minimizar el riesgo de que las pilas de placas se caigan. Ciertos medios en placa **BD** listos para usar se suministran en diferentes tipos de placas, tales como placas divididas (=biplacas), placas de contacto, placas de 150 mm o placas cuadradas, según la aplicación.

Los medios **BD** listos para usar o completados parcialmente suministrados en frascos están disponibles en numerosos tamaños diferentes, volúmenes de llenado y con cierres diferentes, según el uso y la aplicación.

A continuación se ofrece información acerca del estado microbiológico del producto:

Los medios en placa, laminocultivos y determinados medios en frascos se llenan asépticamente. Son sometidos a “control microbiológico”. Para estos medios, la norma DIN EN 12322 admite un nivel de contaminación $\leq 5\%$ ⁵. No obstante, los criterios de autorización internos son más estrictos. Los medios en frascos esterilizados en su recipiente final se etiquetan con el símbolo “estéril”, junto con el símbolo de “termómetro” (para “esterilizado por autoclave”). Para estos medios se aplican los criterios de los productos estériles conforme a la Farmacopea Europea⁶.

En **Materiales no suministrados**, se detalla el equipo especial necesario para realizar la prueba. Los materiales de uso común, tales como asas, esparcidores, pipetas, incubadoras, etc., no se indican aquí porque son de uso obligado en cualquier laboratorio de microbiología.

En **Tipos de muestras**, se indican la muestra o muestras que se han de utilizar con el medio específico. De ser necesario, se detallan los requisitos especiales para la recogida y transporte de la muestra en la sección **Recogida y transporte**.

Las muestras deben recogerse y transportarse apropiadamente, utilizando medios de transporte adecuados para evitar la deshidratación, la exposición excesiva al oxígeno o el crecimiento en exceso de organismos comensales. Además, el tiempo necesario desde la recogida hasta el procesamiento de las muestras en el laboratorio es importante y debe ser lo más breve posible. Se deben consultar en las referencias correspondientes los detalles acerca de los métodos de recogida y transporte de patógenos específicos⁸.

En **Procedimiento de análisis**, se describe la información general y específica para la inoculación del medio determinado y, de ser necesario, el uso de medios adicionales.

Inoculación de los medios

En microbiología, constituye buena práctica de laboratorio que la inoculación de la muestra en los medios se realice mediante la extensión para aislamiento: aplicando tres pasos para extender la muestra en cada placa mediante un asa reesterilizada antes de cada extensión. Si se utilizan asas previamente esterilizadas, se debe utilizar un asa diferente en cada paso de extensión de muestra. Si el material se cultiva directamente empleando una torunda, hacerla girar en una sección pequeña cercana al borde, extendiendo luego para hacer el aislamiento a partir de esta área inoculada por medio de asas, aplicando dos pasos de extensión. Esta técnica permite el aislamiento de colonias individuales a partir de cultivos mixtos. Los cultivos puros, obtenidos de colonias individuales, constituyen un requisito obligatorio para la identificación y el análisis de sensibilidad de los aislados.

Además, se mencionan aquí la temperatura y el tiempo de incubación.

Es buena práctica de laboratorio realizar un examen a intervalos regulares de la **temperatura real de las incubadoras**. Las temperaturas inferiores y superiores al intervalo determinado pueden causar una pérdida de viabilidad de los organismos en los cultivos, una reducción del crecimiento o resultados no reproducibles. Durante la incubación de los medios en placa listos para usar, se debe mantener una **humedad** adecuada, especialmente si se realizan incubaciones durante tiempos prolongados. En este caso, no deben utilizarse incubadoras con circulación de aire, porque los medios pueden deshidratarse mucho, en

especial si la humedad del aire en el laboratorio es baja. Los cultivos en placa de microorganismos adaptados a entornos húmedos, por ej., *Legionella*, deben incubarse en cámaras húmedas o jarras. Las placas también pueden precintarse con cinta adhesiva para reducir la evaporación. Sin embargo, todavía debe ser posible un intercambio mínimo de gas. Esto también se aplica a los medios en tubos: las tapas roscadas siempre deben estar un poco flojas durante la incubación.

En la sección **Resultados**, se proporciona información acerca del aspecto de los organismos en el medio específico. En los medios de aislamiento y crecimiento de uso general, esta información específica no puede proporcionarse para todos los organismos que pueden crecer en el medio. Se deben consultar las referencias correspondientes⁹.

Finalmente, se suministra información específica en la sección **Recuento e interpretación de resultados**. Esta sección se incluye si un diagnóstico depende de la cantidad de patógenos de una muestra. Por ejemplo, esto se aplica a los medios tales como el agar CLED, utilizado para el recuento de bacterias en orina.

CARACTERISTICAS DEL RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se trata el rendimiento del medio y, si procede, los tipos de organismos que se pueden aislar con el medio, junto con las fuentes de evidencia. Para los medios nuevos o de reciente presentación, se pueden incluir aquí los resultados de las evaluaciones de rendimiento.

Se debe hacer hincapié en que sólo en raras ocasiones un único medio es adecuado para detectar todos los organismos de importancia potencial en una muestra. Asimismo, pueden existir cepas individuales dentro de una población microbiana que no crezcan adecuadamente en un medio determinado aunque el medio sea apropiado para la detección de la mayoría de las demás cepas de esta especie. Por tanto, para la mayoría de las muestras, se inoculan entre dos o tres medios diferentes al mismo tiempo, o se combina un medio no selectivo con uno o dos selectivos, o se utilizan dos medios selectivos con diferente grado de selectividad.

También se mencionan aquí **las limitaciones en la aplicación** del medio.

Para la mayoría de los medios, se requieren pruebas adicionales para obtener una identificación final de los organismos aislados.

REFERENCIAS

En esta sección se detalla la bibliografía citada en el documento.

ENVASE Y DISPONIBILIDAD

Se mencionan aquí los **números de catálogo, tamaños de paquetes** y, si procede, los diferentes formatos disponibles.

INFORMACION ADICIONAL

Aquí se detalla información adicional, incluida la dirección del fabricante (con el símbolo de una "fábrica"). Finalmente, se incluyen las marcas comerciales mencionadas en los documentos específicos.

REFERENCIAS CITADAS EN ESTE DOCUMENTO DE INSTRUCCIONES

GENERALES DE USO

1. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal L 331 , 07.12.1998, p. 0001 - 0037
2. Directive 67/548/EEC of the European Parliament and of the Council of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification,

- packaging and labelling of dangerous substances Official Journal P 196, 16.08.1967, p. 0001 – 0098.
3. 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 98/391/EEC). Official Journal L 262, 17.10.2000, p. 0021-0045.
 4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS). Standard M22. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. Wayne, PA, USA. *Search for latest version at www.clsi.org*
 5. DIN EN 12322. 1999. Culture media for microbiology – performance criteria for culture media. Beuth Verlag Berlin.
 6. Council of Europe. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia Secretariat. Strasbourg/France. *Search for latest version at www.pheur.org*
 7. U.S. Pharmacopeial Convention. The U.S. Pharmacopeia /The national formulary. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, Md. *Search for latest version at www.uspnf.com*
 8. Thomson, R.B. 2007. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. *In*: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.
 9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.). 2007. Manual of clinical microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, D.C.

CHROMagar is a trademark of Dr. A. Rambach.

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2009 BD

© 2009 Becton, Dickinson and Company