

1. Objeto

Establecer los procedimientos de Control de Calidad de Medios de Cultivo de la unidad de Microbiología. Evaluar el rendimiento de los medios de cultivo preparados para análisis microbiológicos, efectuando controles de productividad, selectividad y especificidad cuando corresponda.

2. Alcance

No aplica.

3. Referencias Normativas

- Este Procedimiento Técnico de Ensayo aplica para la realización del Control de Calidad de los medios de cultivo o detectores empleados para el procesamiento de muestras en el Laboratorio de Microbiología. Con base en la Norma ISO/TS 11133-1; 11133-2 Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Directrices para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte 1: Directrices generales para la garantía de calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio. Parte 2: Directrices prácticas sobre pruebas de rendimiento de los medios de cultivo.

4. Definiciones

- Control de Calidad:** Conjunto de operaciones técnicas y actividades llevadas a cabo para cumplir con los requerimientos de calidad.
- Criopreservación:** Procedimiento de congelación y almacenamiento de células a muy bajas temperaturas.
- Crioprotector:** Agente que protege los materiales biológicos del daño causado por la formación de cristales intracelulares y las altas concentraciones de solutos necesarias para su criopreservación.
- Incubación:** Almacenamiento de microorganismos a una temperatura definida que generalmente es cercana a su temperatura óptima de crecimiento.
- Lote de Medio de Cultivo:** Unidad completamente trazable de un medio, referido a una cantidad a granel, producto semi-terminado o producto final, el cual es consistente en tipo y calidad, que cumple con los requerimientos de producción (controles en proceso) y test que aseguren la calidad, elaborados en un periodo de producción definido y al cual se le asigna el mismo número de lote. De acuerdo a la evaluación el lote se aprueba o rechaza para uso.
- Medio de Cultivo:** Formulación de sustancias, en forma líquida, semisólida o sólida, la cual contiene constituyentes naturales o sintéticos destinados a dar soporte a la multiplicación (con o sin inhibición de ciertos microorganismos), identificación o preservación de viabilidad de microorganismos.
- Microorganismo o Cepa No Objetivo o No Deseada:** Corresponde a un microorganismo conocido a nivel del género y especie, catalogado y descrito acorde a sus características. Es aquel microorganismo que NO se desarrolla o NO debería desarrollar en el medio de cultivo analizado.
- Microorganismo o Cepa Objetivo o Deseada:** Corresponde a un microorganismo conocido a nivel del género y especie, catalogado y descrito acorde a sus características. Es aquel microorganismo que se desarrolla o debería desarrollar en el medio de cultivo analizado.
- Productividad:** Evaluación de la capacidad de un medio de cultivo de favorecer o permitir el desarrollo de un microorganismo que tenga una reacción “positiva” en dicho medio.
- Selectividad:** Evaluación de la capacidad de un medio de cultivo de inhibir el crecimiento o desarrollo de un microorganismo que NO tenga una reacción “positiva” en dicho medio. (1)

5. Condiciones Generales

Para realizar análisis microbiológicos de manera confiable, es imprescindible utilizar medios de cultivo de calidad probada. Se establecen los criterios de rendimiento mínimos de aceptación mediante los métodos definidos para evaluar las propiedades productivas, selectivas y/o específicas de un medio de cultivo.

El registro correspondiente a los análisis es:

- FO-GAA-188 FORMATO PARA CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo son usados en todas las técnicas tradicionales de cultivo y también en muchas técnicas alternativas. En la unidad de Microbiología las pruebas y procedimientos dependen de que los detectores sean consistentes y proporcionen resultados reproducibles. Muchas formulaciones de medios de cultivo deshidratados que se encuentran comercialmente disponibles, y otras más diseñadas para propósitos específicos de crecimiento, se encuentran descritas en la literatura.

Los requerimientos para los medios de crecimiento son específicos para la muestra y los organismos que se pretenden detectar, por tal razón, se deben llevar a cabo los análisis apropiados para demostrar la aceptabilidad de un lote de medio nuevo y que éste se ajusta al propósito y que puede producir resultados consistentes.

Para todos los medios descritos en métodos estandarizados es esencial definir los criterios de aceptación mínimos que garanticen su confiabilidad, así mismo, dichos criterios son una herramienta para evaluar la productividad, selectividad y otras propiedades de los detectores utilizados cotidianamente en la unidad.

En resumen, la calidad de un detector microbiológico depende de la calidad de los ingredientes básicos, la calidad de los procedimientos de preparación, eliminación de agentes microbianos contaminantes y unas condiciones adecuadas de empaquetado y almacenamiento. (1)

5.1 Medios de cultivo.

5.1.1 Documentación – Recepción – Almacenamiento

En todos los casos, se debe conservar toda la documentación proveniente de la entidad que manufactura el producto/medio de cultivo, la cual deberá especificar el nombre, sus componentes individuales, número de lote, pH, información de almacenamiento, fecha de vencimiento, certificado de control de calidad, organismos de prueba usados, resultados de la evaluación de desempeño con criterios de aceptación, hoja de datos técnicos y de seguridad.

Para cada medio de cultivo nuevo o ingrediente es necesario verificar y registrar: identificación del producto, integridad del recipiente (el sello), fecha de vencimiento, fecha de recepción y fecha de apertura.

Es perentorio seguir las instrucciones de uso y almacenamiento del fabricante debido a que, en la mayoría de los casos, la pérdida de calidad de un medio de cultivo deshidratado o reactivo de trabajo, está relacionada con el almacenamiento y manipulación inadecuada, que modifica sus propiedades y características.

Adicionalmente, es necesario tener en cuenta que el desarrollo de microorganismos sobre detectores depende de un número importante de factores:

- Los nutrientes apropiados deben estar disponibles
 - El oxígeno y otros gases (si se requieren) deben estar disponibles
 - Humedad
 - pH apropiado
 - Temperatura apropiada
 - Esterilidad
- (1,2)

5.1.2 Preparación

La preparación correcta de medios de cultivo o detectores, es uno de los pasos fundamentales en toda evaluación microbiológica, siendo ésta una actividad que requiere cuidado y atención por parte del analista. En el Anexo 1 se presentan los principales inconvenientes que se presentan en la preparación de medios de cultivo.

El primer paso para garantizar la calidad de los detectores consiste en verificar que el procedimiento de lavado de material de vidrio se realice en forma correcta dado que se trata de una etapa crítica en la preparación. Las trazas de detergentes y químicos pueden alterar la composición del detector y por lo tanto el crecimiento de los microorganismos.

Durante la preparación de detectores a partir de formulaciones comerciales, se requiere seguir de forma precisa las instrucciones del fabricante; el analista a cargo debe registrar tanto la relación masa/volumen empleada en la preparación, la fecha de preparación, el nombre del analista y el número del lote de medio preparado (consecutivo interno).

Al igual que en el caso anterior, la preparación de medios de cultivo a partir de componentes individuales debe seguir exactamente las instrucciones definidas para cada detector en particular y el analista debe consignar en los formatos respectivos el nombre de los compuestos, la cantidad pesada y el número del lote asignado al medio, teniendo en cuenta las mismas recomendaciones realizadas para la preparación de medios de cultivo comerciales.

5.1.3 Calidad del Agua

Para cada lote de agua designizada que se emplee en la preparación de medios de cultivo en la unidad, es necesaria la medición de conductividad y una cuantificación microbiana. La conductividad del agua producida debe ser menor a $2 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ a 25°C .

La contaminación microbiana no puede exceder 10^3 mL^{-1} y tiene que estar preferiblemente por debajo de 10^2 mL^{-1} . Cuando se preparan medios de cultivo se registra esta información en el formato designado para control de calidad de medios de cultivo (FO-GAA-188 FORMATO PARA CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO), si se trata de control de calidad de lote de agua para aplicaciones generales en la unidad se registra en el FO-GAA-186 FORMATO DE CONTROL DE CALIDAD AGUA DESTILADA. (1,3)

5.1.4 Rehidratación-Disolución- Esterilización

Para la rehidratación, disolución de componentes y esterilización, es necesario tener en cuenta el tipo de medio de cultivo a utilizar; siga las pautas citadas a continuación:

Medios de Cultivo Comerciales

1. Leer cuidadosamente las instrucciones del fabricante.
2. Realizar una rápida inspección del estado en que se encuentra el producto: homogeneidad del polvo, presencia de aglomeraciones, cambio de color, presencia de humedad. Cualquier medio que observe cambios en su apariencia física debe ser descartado.
3. Asignar código de lote al medio de crecimiento que va a ser preparado, diligenciar el respectivo formato.
4. Verificar que la balanza se encuentre calibrada y nivelada. Pesar de forma precisa la cantidad establecida de medio de cultivo deshidratado.
5. Dispensar la cantidad pesada en el recipiente de trabajo, el cual debe tener un volumen por lo menos un 20% superior al del medio que está siendo preparado.
6. Adicionar el volumen de agua correspondiente. Si es necesario y no se trata de medios con agar, medir y ajustar el pH (NaOH 40g/L – HCl 36.5g/L). Para medios de cultivo líquidos, homogenizar apropiadamente la solución e incorporar en tubos de ensayo.
7. Tapar y esterilizar según corresponda.

En el caso de tubos con agar inclinado, se debe fundir el agar antes de su esterilización empleando un baño María en el que se sumergen en tubos. Se debe tener en cuenta no sobrecalentar el medio de cultivo y retirar del calor inmediatamente se haya producido la fundición. (1,2)

Medios de Cultivo por Composición

Se mantienen las recomendaciones generales. Adicionalmente al momento de pesar los componentes debe tenerse en cuenta que algunos compuestos adicionados pueden interaccionar y generar entre otros fenómenos, alteración de la homogeneidad del medio de cultivo, que hacen necesario realizar disoluciones por separado de cada compuesto. Es necesario verificar siempre el estado de los reactivos empleados y abstenerse de utilizar aquellos que están vencidos o presenten cambios en su apariencia física (hidratación, cambio de color). Para la preparación de medios sólidos es necesaria la incorporación de Agar-Agar. (Ver Anexo 2).

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO TÉCNICO GENERAL PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO			
	Código: IN-GAA-124	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 4 de 13

5.1.5 Almacenamiento

Una vez el medio se ha esterilizado, dejar enfriar a una temperatura entre 47 y 50°C y servir entre 18-20mL en cada caja de Petri. Dejar solidificar el agar tapado en una superficie plana y fría. Verificar el pH del medio, su color y consistencia física.

Se debe rotular cada caja con el nombre del medio de cultivo y su respectivo código de lote según consecutivo interno. Todas las cajas de medio preparadas deben someterse a control de esterilidad, incubándolas a 35°C por 24 horas para su posterior inspección. Si los períodos de incubación a los que serán sometidas las placas se extienden por más de 48 horas, o por encima de 40°C, se debe adicionar un volumen mayor de medio de cultivo (aproximadamente 25 mL). Por cuestiones de seguridad, no se deben colocar las cajas de petri en pilas de más de 6 unidades.

Todas aquellas cajas de agar que observen crecimiento microbiano luego del control de esterilidad serán descartadas y la cantidad debe ser registrada en el respectivo formato de control de calidad de medios de cultivo. Si el medio no se va a utilizar inmediatamente, las cajas deben almacenarse en refrigeración a 5°C + 3°C en bolsas selladas o en otro medio que disminuya la deshidratación y preserve la vida media de los detectores. Con el propósito de evitar la presencia de condensación, las cajas deben enfriarse a temperatura ambiente antes de ser introducidas en la nevera.

Para medios de cultivo almacenados en tubos con tapa rosca u otros recipientes cerrados, se acepta un tiempo de almacenamiento de hasta de tres (3) meses. En el caso de placas de agar almacenadas con cubiertas o en bolsas herméticas a 4°C se recomienda un tiempo de uso máximo de hasta 2 semanas luego de la preparación. (6)

En el caso de medios de cultivo líquidos, se sugiere marcar el nivel del líquido en algunos tubos y monitorear su perdida durante el almacenamiento. Si la pérdida es del 10% o más se debe descartar el lote (6).

Antes de la inoculación de un medio de cultivo sólido, se deben secar las cajas preferiblemente con las tapas removidas y con la superficie del agar hacia abajo, a una temperatura entre 25°C y 50°C en la cabina de flujo laminar, hasta que la humedad haya desaparecido. No sobresecar.

En la preparación de tubos con agar inclinado, colocar los tubos sobre una superficie inclinada, dejar solidificar y realizar el respectivo control de esterilidad. Seguir las instrucciones ya descritas para almacenamiento y uso de medios de cultivo en cajas de Petri. (1,2)

5.2 Control a Lotes de Medios de Cultivo: Contaminación

Una vez los medios de cultivo sean sometidos al control de esterilización, aquellos que presenten contaminación microbiana deben descartarse, el número de cajas contaminadas debe registrarse en el formato de Control de Calidad de Medios de Cultivo correspondiente.

5.2.1 Microorganismos de prueba

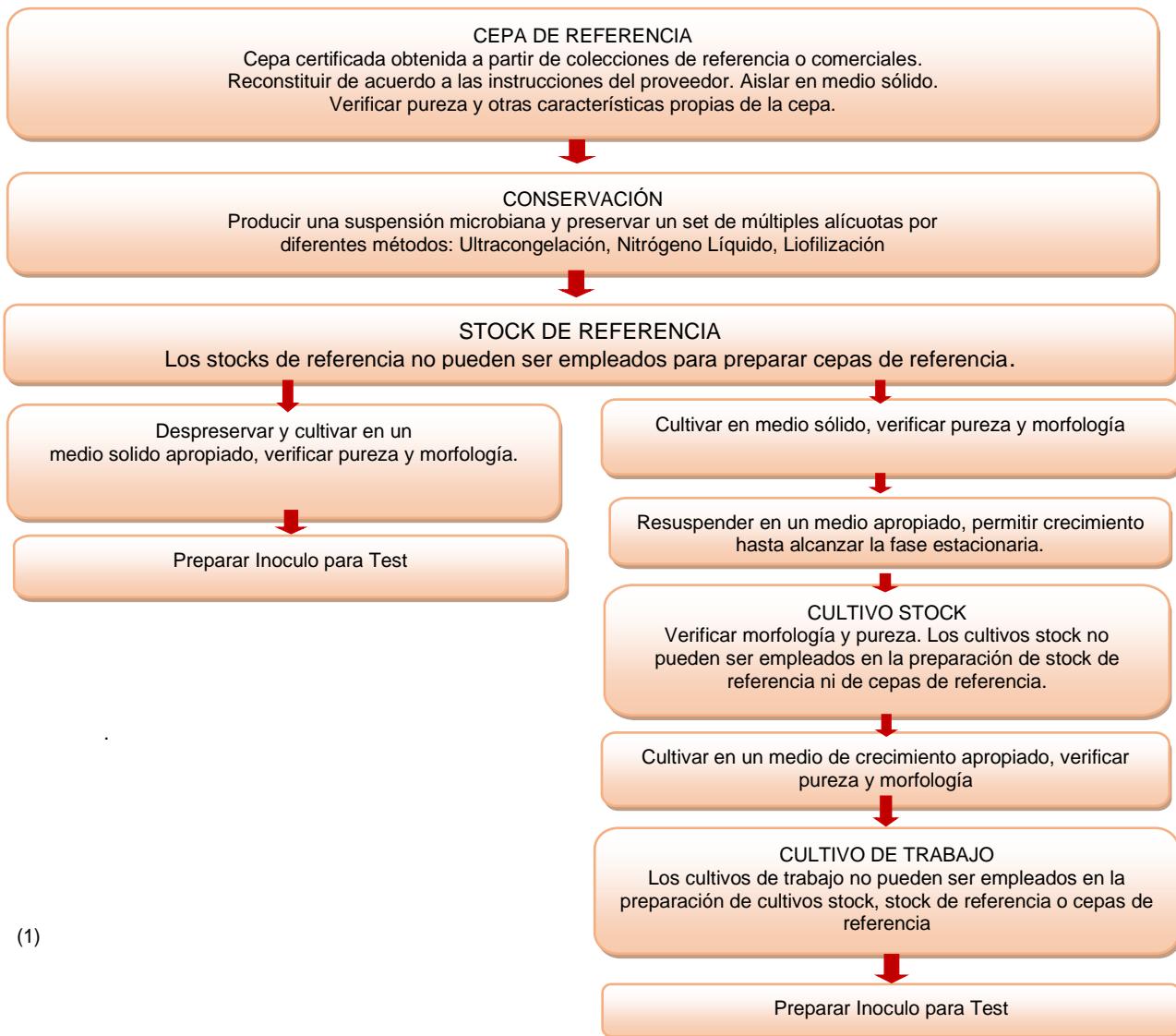
En la tabla 1, se presentan los medios de cultivo objeto de este procedimiento y las cepas control que se utilizan.

Tabla 1. Medios de cultivo del programa de control de calidad y cepas utilizadas.

MEDIO DE CULTIVO	ORGANISMO DESEADO	CODIGO ATCC	ORGANISMO NO DESEADO	CODIGO ATCC
Caldo m- ColiBlue24	<i>Escherichia coli</i>	25922	<i>Klebsiella aerogenes</i>	13048
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	13048	<i>Staphylococcus aureus</i>	6338
Agar m-FC	<i>Escherichia coli</i>	25922	<i>Klebsiella aerogenes</i>	13048
Agar Nutritivo	<i>Klebsiella aerogenes</i>	13048	<i>Escherichia coli</i>	25922
Caldo Nutritivo	<i>Klebsiella aerogenes</i>	13048		
Agar Standar Plate Count (PCA)	<i>Escherichia coli</i>	25922		

5.3 Preservación y Mantenimiento de las Cepas Control

Para la preservación y mantenimiento de las cepas control (Tabla 1) se recomienda seguir el siguiente esquema de trabajo: (Se realiza siguiendo las indicaciones del fabricante del tubo CRYOBANK)



5.3.1 Control de inventario y manipulación

Se debe llevar un sistema de rotulado y seguimiento de los crioviales que asegure una apropiada identificación, localización y fecha de conservación. El rótulo debe incluir un código de identificación y un número de lote del material.

Se debe dejar una porción aparte de stock inicial o "master Stock", de éste se preparan "stocks de trabajo". El sistema de "master stock" asegura que los "stocks de trabajo" están muy cerca al material original. Es necesario elaborar un lote de seguridad o material de custodia y de ser posible almacenarlo en una ubicación remota al master stock y al stock de trabajo.

5.3.2 Cultivo y preparación del microorganismo para criopreservar

La estabilidad y viabilidad de microorganismos sometidos a criopreservación depende del tipo de microorganismo, edad del cultivo, condiciones de crecimiento, cuantificación de población y crioprotector empleado.

El microorganismo puede ser cultivado en medio líquido (caldo) o sólido (agar), para algunos casos, de difícil recuperación, es decir, recuentos bajos, se recomienda centrifugar para remover el sobrenadante y resuspender el precipitado (pellets) en medio líquido fresco que contiene el crioprotector. Para la mayoría de bacterias se recomienda una concentración de 10^7 UFC/ml en fase exponencial tardía para garantizar una buena recuperación. Entre las condiciones que influyen en el proceso de criopreservación están los cultivos que crecen en sistemas aireados, que toleran mejor las condiciones de stress en el proceso de congelamiento, que los cultivos estáticamente crecidos. Nei T. et al, 1969, han estudiado la viabilidad de cultivos aireados y estáticos de *E. coli* después de la congelación, concluyendo que las células aireadas se deshidratan más rápido durante el enfriamiento que los cultivos estáticos, sin embargo, algunas cepas no pueden crecer en agitación y deben ser crecidas en agar antes de la criopreservación.

Las condiciones de cultivo para microorganismos ATCC se pueden encontrar en la página web de la ATCC (<http://www.atcc.org>)

5.3.3 Crioprotector

Las células bacterianas deben ser protegidas durante el proceso de congelación mediante la adición de agentes químicos llamados crioprotectores. La elección del agente depende del tipo de célula a ser preservada. El glicerol es el agente usualmente elegido por ser menos tóxico que el DMSO (Dimetil sulfoxido). Para microorganismos no exigentes, la ATCC recomienda una concentración final de glicerol al 10%, tal concentración se obtiene mediante la adición de glicerol al 20% estéril a un volumen igual de medio de cultivo que contiene el microorganismo. El glicerol penetra la célula retrasando la congelación intracelular y protege contra los efectos de la concentración de solutos. Sin embargo, el DMSO tiene mayor capacidad de penetración y es empleado ampliamente para la conservación de células con estructuras más complejas.

El tiempo de contacto del crioprotector (glicerol 20%) y el cultivo, antes de colocar los viales en enfriamiento se llama período de equilibrio. Este periodo es necesario para asegurar que el crioprotector tenga el tiempo suficiente para penetrar la célula, se debe permitir que el cultivo se equilibre con la sustancia a temperatura ambiente durante mínimo 15 minutos, pero no más de 45-60 minutos. El crioprotector puede ser tóxico si el tiempo de equilibrio es mayor de 60 minutos.

5.3.4 Condiciones de enfriamiento y almacenamiento

Después de la aplicación del crioprotector, el cultivo está listo para la congelación. La formación de cristales de hielo ocurre primero fuera de la célula, como el medio ambiente externo de la célula comienza a congelarse, se produce un incremento de la concentración de solutos. Debido a la diferencia de concentración, a través de la membrana celular bacteriana el agua comienza a migrar desde el interior de la célula al exterior, hasta obtener el equilibrio en la concentración de solutos.

Durante este periodo la tasa de enfriamiento es crítica, las células pueden llegar a deshidratarse demasiado por tasas de enfriamiento muy lentas, igualmente, si las células se congelan rápidamente se produce una mayor formación de hielo intracelular. Mazur et al. han sugerido que la tasa ideal de enfriamiento para las bacterias es de aproximadamente $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

5.3.5 Recuperación

Para reactivar los cultivos preservados, descongelar en un baño termostatado a 37°C o temperatura ambiente, transferir todo el contenido del vial a medio óptimo de crecimiento e incubar a temperatura y condiciones adecuadas. Algunos microorganismos pueden necesitar mayor tiempo para su reactivación. Los cultivos deben ser verificados; viabilidad y pureza.

1. Descongelar en baño termostatado a 37°C o temperatura ambiente, agitando suavemente para acelerar el

proceso. Remover el vial y desinfectar con alcohol su superficie externa antes de abrirlo.

- Efectuar prueba de viabilidad. Cultivar en los medios apropiados e incubar a temperatura óptima de crecimiento (varía de acuerdo al tipo de microorganismo: psicrófilo 10°C, mesófilo 32°C, termófilo 60°C ó hipertermófilo 80°C). Pasado el tiempo de incubación de 24 horas realizar la caracterización de las colonias con la descripción macroscópica y microscópica de la colonia (Coloración de Gram), además de otras pruebas complementarias.

5.4 Control de Calidad a Medios de Cultivo

Este procedimiento aplica para cada medio comercial nuevo y mensualmente para el 10% de las cajas del primer lote de cada uno de los medios incluidos en este documento.

5.4.1 Estandarización de las cepas de control

Aplica para microorganismos *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*,

Procedimiento:

- Sembrar el microorganismo a estandarizar en caja de agar no selectivo.
- Incubar por 24 horas a 35°C±1°C.
- Adicionar a un tubo de ensayo 5 ml de solución Ringer o solución salina al 0.85%, esterilizar y suspender el cultivo en la solución con ayuda de un asa estéril.
- Hacer diluciones seriadas y consecutivas del cultivo hasta 10^{-8}
- Realizar el recuento de las diluciones requeridas para alcanzar el título esperado
- Incubar a 35±1 °C por 24 horas.
- Realizar las lecturas.
- Verificar para cada microorganismo la dilución a la que se alcanza el título esperado dependiendo de si se trata de un organismo deseado o no deseado y del control a realizar de acuerdo a las indicaciones de este procedimiento.
- Verificar el porcentaje de recuperación para cada dilución y comparar con el valor teórico (considerando que para el 65%T se calcula un título aproximado de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).
- Registrar los resultados de estandarización del inóculo en el formato.

5.4.1.1 Concentraciones o densidad microbiana de trabajo del microorganismo deseado

Para ensayos cuantitativos de productividad se requiere de una concentración de 10^2 UFC/mL del microorganismo deseado preparado de acuerdo a lo establecido.

Para ensayos semicuantitativos y cualitativos de productividad, se requiere de una concentración entre 10^4 a 10^5 UFC/mL del microorganismo deseado preparado de acuerdo a lo establecido en el ítem 3.4.a.

Para ensayos de productividad en medios líquidos se requiere una concentración de 10^2 a 10^3 UFC/mL del microorganismo deseado preparado de acuerdo a lo establecido.

5.4.1.2 Concentraciones o densidad microbiana de trabajo del microorganismo no deseado

Para ensayos de selectividad en caja o tubo se requiere de una concentración entre 10^5 a 10^7 UFC/mL del microorganismo no deseado preparado de acuerdo a lo establecido.

5.4.2 Método de Productividad y Selectividad para Medios de Cultivo Sólidos

5.4.2.1 Método Cuantitativo para cálculo de productividad en medios sólidos

Este método se emplea para la evaluación del medio Plate Count Agar (PCA), el cual será el agar de prueba, tomando como medio de referencia el Agar TSA (Tryptic Soy Agar). Considerando como inóculo la cepa *Escherichia coli* con un título ajustado a 10^2 UFC/mL de acuerdo a lo establecido.

Procedimiento:

1. Preparar el inóculo de *Escherichia coli* partiendo de cultivo en agar nutritivo y diluir hasta una concentración de 10^2 UFC/mL de acuerdo a lo establecido.
2. Sembrar por duplicado en superficie en el agar PCA y en agar TSA.
3. Asegurarse que las superficies de las cajas estén bien secas.
4. Incubar por 24 horas a $35\pm1^\circ\text{C}$.
5. Contar las colonias y promediar para cada medio de cultivo.
6. Calcular la Productividad (PR) del medio PCA según formula: $\text{PR} = \text{Ns} / \text{N0}$
Donde,
 Ns = Es el promedio de los recuentos obtenidos en el medio de cultivo sometido al ensayo (Agar PCA).
 N0 = Es el promedio de los recuentos obtenidos en el medio de cultivo de referencia (Agar TSA) y, debe ser ≥ 100 ufc.
7. Interpretación: Para el medio Plate Count Agar (PCA), se consideran aceptables productividades superiores o iguales a 0.7 (PR: >0.7). Por las características del PCA no aplica para el cálculo de selectividad.
8. Registrar los resultados de productividad del medio evaluado en el formato establecido.

5.4.2.2 Método semicuantitativo basado en ecométrico para medios sólidos

Este procedimiento aplica para la evaluación de los medios de cultivo:

1. medio m-FC con las cepas *Escherichia coli* como organismos deseados en título entre 10^4 a 10^5 UFC/mL y *Klebsiella aerogenes* como organismo no deseado en título entre 10^5 a 10^7 UFC/mL. Títulos ajustados mediante el procedimiento descrito.

Procedimiento:

1. Preparar los inóculos de las cepas partiendo de cultivo en agar nutritivo y diluir hasta la concentración establecida.
2. Sembrar en estría y a partir de la dilución del microorganismo establecida, las cajas de agar con un asa de argolla de $10 \mu\text{L}$, realizando cuatro líneas paralelas a intervalos aproximadamente de 0,5 cm en el sector A. la siembra en estría se repite en los sectores B y C y se acaba en el sector D con una sola línea. Se puede utilizar la plantilla del anexo 3, la cual se coloca bajo la caja de agar para facilitar la siembra en estría.
3. Se emplea la misma asa para sembrar en estría todos los sectores y sin flamear entre las estrías, el ángulo de siembra es 20 a 30 grados.
4. Incubar así: agar m-FC A 44°C por 24 horas.
5. Despues del periodo de incubación, revisar la apariencia, tamaño de las colonias e intensidad del crecimiento y hacer el cálculo del índice de crecimiento G_1 obtenido por la cepa deseada en donde cada línea así:
 - Cada línea de siembra que muestre crecimiento completo se califica con 1.
 - El máximo puntaje por caja es de 16.
 - La estría se califica con 0,5 si el crecimiento solo ocurre en la mitad de la longitud total de la línea.
 - Una estría sin crecimiento o con menos de la mitad, se califica como 0.
 - Sumar los puntajes para obtener el índice G_1 .
6. Interpretación: El índice de crecimiento obtenido a partir de la evaluación de una cepa de referencia debe ser de por lo menos 6 para concluir que el medio es aceptable. El crecimiento de las cepas deseadas debe ser típico y el de las no deseadas debe encontrarse parcial o completamente inhibido.
7. Registrar el índice G_1 para el lote de medio evaluado en el formato establecido.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS®	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO TÉCNICO GENERAL PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO		
	Código: IN-GAA-124	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022

5.4.2.3 Método cualitativo de siembra en estría

Este procedimiento aplica para la evaluación de los medios de cultivo:

1. Agar Nutritivo con la cepa *Klebsiella aerogenes* como organismo deseado en título entre 10^4 a 10^5 UFC/mL. Título ajustado mediante el procedimiento descrito.

Procedimiento:

1. Preparar los inóculos de las cepas partiendo de cultivo en agar nutritivo y diluir hasta la concentración establecida.
2. Sembrar en estría y a partir de la dilución del microorganismo establecida, las cajas de agar con un asa de argolla de $10 \mu\text{L}$, realizando una siembra en líneas rectas paralelas en la superficie del agar.
3. Incubar a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24-48 horas.
4. Interpretación:
 0=Corresponde a ausencia de crecimiento
 1=Corresponde a crecimiento débil
 2=Corresponde a buen crecimiento
5. Los microorganismos deseados deben tener un puntaje de 2 y mostrar una apariencia típica, tamaño y morfología de la colonia. El crecimiento de los microorganismos no deseados debe encontrarse parcial o completamente inhibido.
6. Registrar los resultados de la prueba cualitativa del medio sólido evaluado en el formato establecido.

5.4.2.4 Método cualitativo para medios líquidos

Este procedimiento aplica para la evaluación de los medios de cultivo:

1. Caldo Nutritivo con la cepa *Klebsiella aerogenes* como organismo deseado en título entre 10 a 10^3 UFC/mL.
2. Caldo m-Coliblu24, medio m-FC con las cepas *Escherichia coli* y/o *Klebsiella aerogenes* como organismos deseados en título entre 10^4 a 10^5 UFC/mL y *Staphylococcus aureus* como organismo no deseado en título entre 10^5 a 10^7 UFC/mL. Títulos ajustados mediante el procedimiento descrito.

Procedimiento:

1. Preparar tubos con 10 mL del caldo o medio a evaluar.
2. Inocular a partir de un pase fresco en agar de la cepa o del último pase líquido cada microorganismo en un tubo con 10 mL del medio a evaluar.
3. Incubar durante 24 horas (*Escherichia coli* y/o *Klebsiella aerogenes*) a 35°C
4. Homogenizar el inóculo en vórtex.
5. Marcar los tubos de ensayo con 10 mL del medio de cultivo preparado con el nombre del microorganismo.
6. Tomar $10 \mu\text{L}$ del cultivo con un asa estéril o con micropipeta y suspender en el caldo a evaluar.
7. Homogenizar y llevar a incubación por 24 horas a 35°C para la cepa *Klebsiella aerogenes* Calificar el medio de cultivo de acuerdo a la turbidez obtenida o en el caso de que haya producción de gas o ennegrecimiento, asignando puntajes así:
 0= Sin turbidez o ennegrecimiento
 1= Turbiedad leve o ennegrecimiento leve
 2= Bastante turbiedad o ennegrecimiento total
8. Registrar los resultados de la prueba cualitativa del medio sólido evaluado en el formato establecido.

5.5 Buenas Prácticas de la unidad

Se tienen las siguientes premisas como Buenas Prácticas para el área de microbiología con base en la GTC 82 (4) y la NTC 4092. (5)

Higiene del Personal	Implementos de Seguridad	Equipos y materiales	Precauciones durante el análisis
No usar la bata fuera del área de trabajo	Bata manga larga	Todo el material debe estar limpio y estéril, taponar las pipetas con algodón.	Limpiar muy bien el área y verificar ausencia de corrientes de aire (puertas y ventanas cerradas)
Usar protección para el cabello	Gafas de seguridad		
Mantener las uñas cortas y aseadas	Guantes de nitrilo (resistentes a solventes)		Descontaminar la superficie de trabajo antes y después de trabajar con un desinfectante de Superficies.
Lavarse las manos con abundante agua antes y luego del trabajo	Gorro y tapabocas	Todos los materiales deben esterilizarse antes de su uso por calor seco, húmedo o inmersión en solución Desinfectante	
Evitar hablar o toser cuando se está inoculando	Protección auditiva		Contar con el material requerido
No fumar o comer en las áreas de prueba	Zapatos con suela antideslizante	Revisar que el material estéril no tenga más de 8 días de almacenamiento	Trabajar en cabina de seguridad o cerca de un mechero
Tomar precauciones especiales si se tienen infecciones o enfermedades en las que los microorganismos puedan invalidar los resultados		Revisar estado de medios de cultivo y soluciones (pruebas esterilidad, fecha preparación apariencia)	Realizar el trabajo tan rápido como sea posible
No almacenar alimentos o productos de consumo personal en refrigeradores de la unidad			Esterilizar en llama asas bacteriológicas antes y luego del uso
			Colocar pipetas y espártulas en recipientes con desinfectante apropiado

6. Desarrollo

	Actividad	Responsable	Descripción
1	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Recepción Medio de Cultivo / Ingredientes </div>	Analista de la unidad	Verificar y almacenar información del fabricante. Realizar los registros de ingreso y seguir las especificaciones del numeral Asignar el código respectivo al reactivo que ingresa según el consecutivo interno, almacenar según las disposiciones del fabricante.
2	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> ↓ Preparación del medio de cultivo </div>	Analista de la unidad	Preparar el medio de cultivo siguiendo las indicaciones Seguir cada uno de las indicaciones del fabricante o del instructivo de preparación de medios por composición. Abstenerse de emplear componentes que presenten alteraciones en su apariencia física. Asignar código de lote y diligenciar los formatos respectivos
3	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> ↓ Pruebas de control de calidad </div>	Analista de la unidad	Llevar a cabo la preparación de los inóculos de trabajo para la evaluación de los medios de cultivo respectivos. Diligenciar el formato de seguimiento de control de calidad de medios de cultivo.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS®	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO TÉCNICO GENERAL PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO		
	Código: IN-GAA-124	Versión: 03	Fecha de aprobación: 03/08/2022

7. Flujoograma:

No aplica

8. Documentos de referencia

- Norma ISO/TS 11133-1 11133-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines on preparation and production of culture media- Part 1: General guidelines in quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory-Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Preparación de Medios de Cultivo. Versión 1. 18/09/08.
- Norma ISO 9998:1991 Water quality- Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality test.
- Guía Técnica Colombiana GTC 82:2000. Guía de Buenas Prácticas para Laboratorios que realizan muestreo y análisis de agua. Correlación: ASTM D-3856-95 (Re aprobada 2000).
- Norma Técnica Colombiana NTC 4092:1997. Microbiología de alimentos para animales. Reglas generales para el análisis microbiológico. Norma correspondiente a la ISO 7218.
- Standar Methods for the examination of water & waste. 23 th Edition. Section 9060 A. Samples Collection.
- Instructivo GTN-I-961_ Instructivo General Para el Control de Calidad de Medios de Cultivo. Gestión de Tecnología de Negocio. Departamento de Servicio Técnico de Laboratorio de Transporte y Transversales. Laboratorio de biotecnología. Instituto Colombiano de Petróleos.

9. Listado de anexos

- **Anexo 1:** Anormalidades en la preparación de medios de cultivo
- **Anexo 2:** Esquema de siembra ecométrico

10. Historial de Cambios:

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	22/02/2019	Documento nuevo	Nolvis Nieves Bacterióloga		Marco Aurelio Torres Director ICAOC
02	15/05/2019	Se complementó el numeral 5.3 Preservación y Mantenimiento de las Cepas Control (se adiciono manejo, almacenamiento y recuperación de las cepas de referencia), además se incluyeron definiciones.	Nolvis Nieves Bacterióloga	Marlene Estrada Líder Técnico Laboratorio	Mario Gutiérrez Prof. Calidad
03	03/08/2022	Actualización de las cepas de referencia para la verificación del método de filtración por membrana y calidad de medios de cultivo	Yair Zapata Biólogo	Karen Mendoza Prof. Calidad CCA	Juan M Trujillo Director CCA

ANEXO 1. ANOMALÍAS EN LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

ANORMALIDAD	POSIBLE RAZON
El medio de cultivo no se solidifica	<ul style="list-style-type: none"> • Sobrecalentamiento del medio durante su preparación. • pH bajo, causando hidrólisis acida. • El Agar no se disolvió apropiadamente. • Pobre mezcla de los ingredientes.
pH Incorrecto	<ul style="list-style-type: none"> • Sobrecalentamiento del medio durante su preparación. • Pobre calidad del agua. • Contaminación química exógena. • pH medido a una temperatura incorrecta. • pH metro no calibrado. • Dudosa calidad del medio deshidratado/reactivos. • Mezcla inapropiada o incompleta • Esterilización excesiva
Color anormal	<ul style="list-style-type: none"> • Sobrecalentamiento del medio durante su preparación. • Pobre calidad del agua. • Dudosa calidad del medio deshidratado/reactivos. • pH incorrecto • Se pesaron incorrectamente las cantidades de los ingredientes. • Contaminación
Formación de precipitados	<ul style="list-style-type: none"> • Sobrecalentamiento del medio durante su preparación. • Pobre calidad del agua. • Dudosa calidad del medio deshidratado/reactivos. • Inadecuado control de pH.
Medio inhibitorio/Productividad baja	<ul style="list-style-type: none"> • Sobrecalentamiento del medio durante su preparación. • Dudosa calidad del medio deshidratado/reactivos • Pobre calidad del agua. • Se pesaron incorrectamente las cantidades de los ingredientes. No se siguió adecuadamente la formulación • Presencia de residuos tóxicos en el material de preparación o en el agua.
Pobre selectividad	<ul style="list-style-type: none"> • Sobrecalentamiento del medio durante su preparación. • Dudosa calidad del medio deshidratado/reactivos. • Se pesaron incorrectamente las cantidades de los ingredientes. No se siguió adecuadamente la formulación • Suplementos contaminados
Contaminación	<ul style="list-style-type: none"> • Esterilización inadecuada • Técnicas asépticas deficientes • Suplementos contaminados

(1)

ANEXO 2. ESQUEMA DE SIEMBRA ECOMETRICO

