

# SmartNotes

## ¿Cómo puedo ahorrar tiempo y reducir el gasto al preparar medios de cultivo?

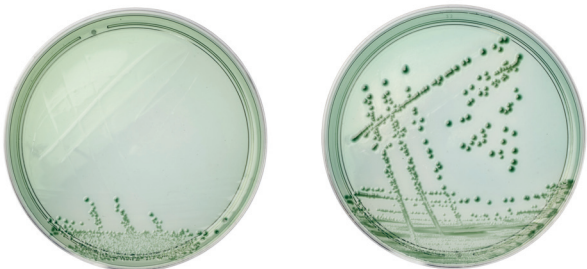
# QA

Los medios de cultivo forman parte de casi todos los métodos de detección y enumeración microbiana llevados a cabo en el laboratorio de microbiología. Garantizar la idoneidad de uso de un medio de cultivo es fundamental para garantizar resultados exactos y fáciles de interpretar. Los medios de cultivo de calidad inferior pueden dar lugar a una o varias de las características siguientes:

- Reducción de las tasas de crecimiento/recuperación
- Morfología o reacciones de colonias atípicas
- Inhibición del microorganismo de interés
- Imposibilidad de inhibir la flora competidora
- Reducción de la vida útil del medio preparado



**Figura 1.** Agar verde brillante inoculado con el género *Proteus*. El medio de la izquierda se ha sobrecalentado y muestra una selectividad reducida. La selectividad del colorante verde brillante se reduce con el calentamiento.



**Figura 2.** Medio de cólera (TCBS) inoculado con *Vibrio cholera*. El medio de la izquierda se ha sobrecalentado y muestra un crecimiento reducido.

Estos resultados pueden afectar a la exactitud de la notificación de los resultados del paciente o bien a la calidad y la seguridad de los productos alimentarios y las muestras asociadas. Como resultado, las acciones correctivas que se pueden evitar (como notificaciones de calidad y retiradas) pueden poner en riesgo la reputación y la situación financiera de una organización. En el peor de los casos, puede ponerse en peligro la salud e incluso la vida de los pacientes o los consumidores.

Aquí respondemos a las preguntas más frecuentes en cinco áreas principales, con el fin de facilitarle la preparación de medios adecuados para su uso, la primera vez y en todo momento.

## 1. ¿Cuáles son las mejores condiciones de almacenamiento para los medios de cultivo deshidratados y los suplementos?

Asegúrese siempre de que los productos empleados en la preparación de medios de cultivo no superen su vida útil y se almacenen bajo las condiciones que especifica el fabricante. Los proveedores de medios de cultivo determinan la vida útil total de los envases sin abrir almacenados en las condiciones adecuadas. Una vez abiertos, los productos se pueden deteriorar si no se manipulan y almacenan correctamente. Por ejemplo, la mayoría de los medios de cultivo deshidratados son higroscópicos; es decir, que absorben la humedad fácilmente. Esto afectará a características físicas como el color y el pH. Además, puede afectar al rendimiento microbiológico del medio.

Los principales enemigos de los medios de cultivo deshidratados son la humedad, el calor y la luz. Compruebe siempre los envases para verificar que las condiciones de almacenamiento son correctas pero, como norma general, almacene los medios de cultivo deshidratados en las condiciones siguientes:

- Almacénelos a temperatura ambiente, es decir, 10-30 °C, y evite las fluctuaciones de temperatura de más de unos grados (la mayoría de los productos suplementarios requieren un almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 2 °C y 8 °C).
- Protéjalos de la luz solar directa (el envase original protegerá los productos, pero evite almacenarlos en el alféizar de una ventana o en zonas similares).
- Asegúrese de que los productos abiertos estén completamente cerrados.
- Evite almacenarlos en condiciones de calor y humedad, como salas de esterilización en autoclave o zonas de lavado.



**Figura 3.** Compruebe que los productos empleados en la preparación de los medios de cultivo se almacenen según las condiciones especificadas por el fabricante. De este modo se evita el deterioro, por ejemplo, el provocado por la humedad, como se muestra en la imagen de la derecha.

## 2. ¿Cómo puedo reconstituir un medio de cultivo deshidratado para obtener el mejor rendimiento?

Siga las instrucciones del proveedor y consulte las fichas de datos de seguridad antes de preparar los medios.

- Asegúrese de que los vasos, los recipientes empleados para el pesaje y otros utensilios estén limpios.
- Debe usarse agua recién purificada para reconstituir los medios de cultivo deshidratados, es decir, destilada, desionizada, producida mediante ósmosis inversa o de calidad equivalente. El agua del grifo no es adecuada, ya que contiene impurezas que pueden afectar a las características del medio. Es recomendable que la conductividad esté por debajo de 15 microsiemens ( $\mu\text{Scm}^{-1}$ ) y es preferible que se sitúe por debajo de 5  $\mu\text{Scm}^{-1}$  (equivalente a una resistividad de 0,2 M $\Omega$ ). El agua se debe almacenar en recipientes fabricados con materiales inertes. El almacenamiento en envases de polietileno puede dar lugar a un pH ácido, mientras que el almacenamiento en vidrio sódico puede provocar una desviación alcalina.
- Prepare el medio de cultivo en un recipiente de aproximadamente dos veces el volumen final para que se pueda mezclar bien.
- Abra el recipiente del medio de cultivo deshidratado lejos de las corrientes de aire y la humedad. Use una cámara de flujo laminar para controlar el polvo o bien equipo de protección individual. Se debe usar una báscula que pueda alcanzar una tolerancia del 1 %.
- El volumen de agua necesario se debe medir y verter la mitad en el recipiente de preparación, tras lo cual se debe añadir el medio pesado. Agite enérgicamente para mezclar todo y, a continuación, añada el resto del agua por los lados para que el medio que se ha adherido se vierta en la solución.
- Los medios que contienen agar deben calentarse para disolver el agar antes de la esterilización. Para ello, llévelos con cuidado hasta el punto de ebullición mientras se realiza la mezcla.
- El medio se debe esterilizar en el día de su preparación. Las tapas de los frascos con tapones de rosca se deben cerrar holgadamente antes de colocarlos en un esterilizador en autoclave. De este modo, se permite el escape del aire calentado.
- Excepto si se especifica lo contrario, el pH del medio no debe ajustarse antes de la esterilización. Debe medirse después de la esterilización y según el intervalo de pH especificado.

## 3. ¿Cuál es la técnica de esterilización adecuada para mi medio?

Los medios de cultivo deshidratados y el agua que se emplea para prepararlos no son estériles, así que por lo general contendrán al menos algunos microorganismos. Si el medio de cultivo no se esteriliza antes de su uso, estos microorganismos se mezclarán con los presentes en la muestra de la prueba y podrían dar lugar a resultados positivos falsos. Además, el componente de agar de los medios debe calentarse a unos 100 °C para disolverse en el agua antes de que pueda desarrollar su estado semisólido con el enfriamiento. La esterilización se puede lograr mediante varias técnicas distintas. Los medios más sensibles requieren condiciones de esterilización menos rigurosas en comparación con las formulaciones más resistentes. La esterilización es la parte del proceso de preparación de medios que puede provocar

más daños. Por ello, se debe prestar una atención especial para garantizar su correcta realización.

Los medios de cultivo se dañan debido al proceso de calentamiento. El tratamiento con calor de medios de cultivo complejos que contienen péptidos, azúcares, minerales y metales da lugar a una destrucción de los nutrientes, ya sea mediante degradación térmica directa o mediante reacción entre los componentes del medio. También pueden formarse productos tóxicos generados por oxidación química durante el tratamiento con calor. El calentamiento también puede reducir la selectividad del medio. Por tanto, es importante optimizar el proceso para que el medio sea estéril tras el calentamiento con un daño mínimo.

A pesar de los esfuerzos, puede producirse degradación al esterilizar recipientes con más de un litro de medio. Esto se debe a los tiempos prolongados de penetración del calor y de enfriamiento, pero también podría agravarse por el diseño de la



**Figura 4.** A: medio sobrecalentado. Color oscuro, pH bajo que provoca una reducción del crecimiento de microorganismos de cultivo exigente. B: medio correctamente esterilizado, con un color más claro.

esterilización en autoclave. Esto sucede especialmente cuando la fase de enfriamiento del proceso no cuenta con el apoyo de ventiladores, si se aplica agua de refrigeración en una cubierta o si se utilizan métodos de enfriamiento por aspersión.

Con frecuencia, los recipientes que muestran el peor rendimiento por degradación se encontrarán en el centro de una carga muy apretada. Tanto el tiempo de penetración del calor como el de enfriamiento se pueden optimizar si se garantiza que el autoclave no esté sobrecargado y que los recipientes estén diseminados dentro de la cámara, de modo que se proporcione un espacio uniforme entre ellos y las paredes de la cámara.

Una forma sencilla de reducir al mínimo la degradación por calor es asegurarse de que el tiempo de retención de la esterilización no sea superior al necesario, así como que la temperatura de esterilización no sea más alta de lo necesario para garantizar la esterilidad. En la siguiente tabla se indica que un minuto a 124 °C es el equivalente térmico de 1,95 minutos a 121,1 °C, casi el doble de entrada de calor y degradación asociada. En la tabla se utiliza el concepto de  $F_0$  (Keith Shuttleworth & Associates Ltd) de un minuto a 121 °C equivalente a un  $F_0$  de 1 para comparar el equivalente térmico de distintas temperaturas con un estándar de 121 °C.

Se puede usar la misma tabla para evaluar el impacto de los tiempos prolongados de penetración del calor y de enfriamiento y, en casos excepcionales, podría usarse para reducir el tiempo de retención de la esterilización a fin de obtener un proceso con un mínimo absoluto de 15  $F_0$ . Si esto se realizara, sería después del proceso de optimización que se ha descrito anteriormente y requeriría una validación con un registrador de la temperatura capaz de calcular  $F_0$ .

**Tabla 1. Valores de  $F_0$  calculados a 121,1 °C**

Temperatura (°C) en el recipiente de carga durante 1 minuto	$F_0$ : es equivalente a x minutos a 121,1 °C
113	0,15
114	0,19
115	0,25
116	0,31
117	0,39
118	0,49
119	0,62
120	0,78
121	0,98
122	1,23
123	1,55
124	1,95
125	2,45

### Sugerencias para el uso de autoclaves

- Tenga en cuenta que el tiempo y la temperatura que se proporcionan en las instrucciones de esterilización del medio siempre hacen referencia a las condiciones dentro del recipiente del medio y no dentro de la cámara de autoclave.
- El autoclave debe calibrarse. El proceso de esterilización debe validarse con termopares más que con registradores de datos.
- Un proceso ideal contará con una fase de calentamiento y enfriamiento rápida y uniforme.
- No se deben procesar juntos recipientes de tamaños muy diferentes. Los recipientes de tamaños similares se pueden validar como "familia" de productos.
- El autoclave no debe sobrecargarse. Las cargas deben ser uniformes en cuanto al espacio entre los recipientes y los lados de la cámara.
- Deben evitarse las temperaturas y tiempos de retención de esterilización excesivos.
- Aunque siempre se deben seguir las instrucciones del fabricante para la esterilización, en caso de producirse degradación y de no poder resolverse con los factores anteriores, puede considerarse el uso del enfoque de  $F_0$ .
- Esto permite comparar el proceso de esterilización en distintos autoclaves y revisar el ciclo.
- Todos los autoclaves se deben comprobar en periodos de tiempo fijos para garantizar su correcto funcionamiento. Se deben llevar a cabo el mantenimiento y la validación del autoclave siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Preparadores de medios

La mayoría de las dificultades en la esterilización de los medios de cultivo tienen lugar al procesar grandes volúmenes. Una solución a este problema es utilizar preparadores de medios que están diseñados para esterilizar grandes volúmenes de medio de cultivo (superiores a un litro). Así se supera el problema de la penetración de calor insuficiente del agar mediante la agitación continua del medio durante la fase de calentamiento. Se presentan en varios tamaños de recipiente, son generalmente más rápidos que los autoclaves en términos de tiempo de análisis y pueden alcanzar temperaturas mayores y tiempos de permanencia más breves. Se recomiendan encarecidamente debido a su alta eficiencia y a su menor daño térmico. El enfriamiento es rápido y se ajusta automáticamente a las temperaturas de retención establecidas previamente.

El preparador debe lavarse y enjuagarse minuciosamente después de cada uso. Se debe tener mucho cuidado para evitar el arrastre de un análisis a otro y puede que ciertos medios requieran unos tubos especiales. Se debe realizar la validación con cada ciclo de funcionamiento y con cada volumen que se utilice. El preparador debe mantenerse en un buen estado de funcionamiento y debe realizarse su mantenimiento según las instrucciones del fabricante.



Figura 5. Preparadores de medios de cultivo en un contexto comercial.

### Microondas

Los hornos microondas no están recomendados para esterilizar o fundir los medios de cultivo. Las razones son las siguientes:

- El calentamiento puede ser irregular.
- Pueden generarse zonas calientes en la columna de medio, lo que provoca el sobrecalentamiento y la explosión de los recipientes.
- La esterilización mediante microondas solo es efectiva en caso de humedad. Las partes interiores superiores de los recipientes, si no se esterilizan previamente, pueden ser una fuente de contaminación.

### 4. ¿Cuál es la mejor forma de preparar medios de cultivo esterilizados?

Los medios líquidos sin suplementos se esterilizan generalmente en sus recipientes finales. Las tapas deben aflojarse antes de la esterilización y cerrarse bien después de la esterilización en autoclave. Deben enfriarse a temperatura ambiente. Los medios de agar se deben enfriar en la mesa durante varios minutos para evitar un choque térmico, antes de colocarlos en un baño de agua con una temperatura aproximada de 50 °C. Si el medio se va a usar en un método de vertido en placa, donde el medio se añade a la muestra de prueba, debe templarse entre 44 °C y 47 °C, o bien como especifique el método estándar pertinente. El medio se debe distribuir en cuanto alcance la temperatura o bien puede retenerse durante un máximo de cuatro horas en el baño de agua. Esto puede variar según el medio y, para algunos medios, puede que deba acortarse el tiempo de retención.

### Suplementación de medios de cultivo

Los suplementos termolábiles se deben añadir al medio tras un enfriamiento a 50 °C o bien como se indique. Los suplementos estériles deben estar a temperatura ambiente

antes de añadirlos al medio de agar, ya que los líquidos fríos podrían convertir el agar en gel o formar escamas transparentes. Todos los suplementos de deben mezclar en el medio con cuidado y minuciosamente, y deben distribuirse en los recipientes finales lo más rápido posible.

La sangre empleada para la preparación de agar sangre debe ser lo más reciente posible y debe haberse almacenado a entre 2 °C y 8 °C (la sangre no se debe congelar). La sangre debe estar a temperatura ambiente antes de añadirse al medio o puede calentarse en un incubador entre 30 °C y 37 °C. No la deje en el incubador durante más tiempo del necesario. Es fundamental mezclarlo todo suficientemente en un recipiente con mucho espacio para garantizar la aireación de la sangre.

Para que los medios sean selectivos, se suelen usar antibióticos solos y mezclas de antibióticos. Se presentan generalmente como suplementos liofilizados para añadirse a los medios base. Los suplementos se deben almacenar según las indicaciones. Es decir, habitualmente a una temperatura comprendida entre 2 °C y 8 °C. No obstante, es posible que algunos suplementos requieran almacenarse congelados. Las instrucciones que figuran en el envase deben seguirse para garantizar el correcto almacenamiento del producto.

La reconstitución de suplementos selectivos se debe realizar siguiendo las instrucciones de uso y respetando todas las advertencias de salud y seguridad. Debido a la naturaleza termolábil de la mayoría de los antibióticos, las instrucciones normalmente especifican una adición aséptica tras la esterilización y el enfriamiento por debajo de 50 °C. Unos pocos antibióticos, como el cloranfenicol y la kanamicina, son termoestables y se pueden añadir antes de la esterilización.

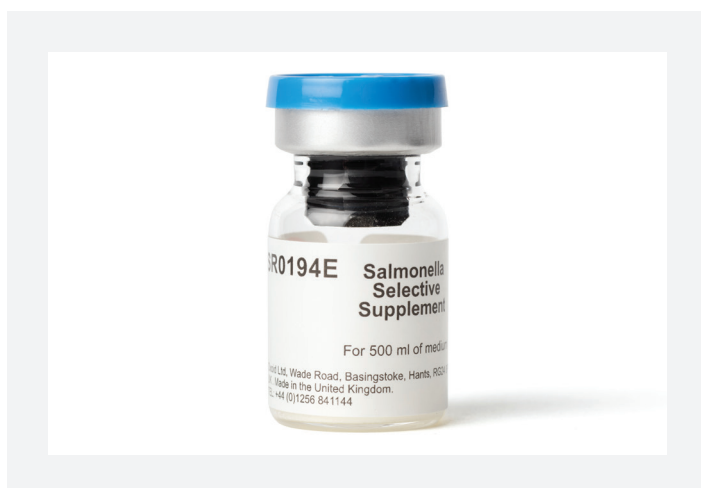


Figura 6. Suplemento selectivo liofilizado.

### Preparación de placas de agar

- Se debe usar una técnica aséptica adecuada durante todo el proceso.
- Después del enfriamiento a 50 °C o según se requiera con la adición de suplementos estériles, el medio debe mezclarse con cuidado y minuciosamente, sin que se formen burbujas y distribuirse de forma aséptica en las placas de Petri estériles.
- Las placas de Petri deben estar en una superficie nivelada y el agar debe verterse de forma que se obtenga una placa uniforme y sin burbujas.
- Se debe verter suficiente medio en las placas de Petri. Por ejemplo, para una placa de 90 mm, un volumen entre 18 ml y 20 ml debería ser suficiente. Si las placas van a almacenarse, exponerse a un entorno sin tapas, como en placas de sedimentación, van a someterse a incubación prolongada o a incubación por encima de 37 °C, puede ser necesario un volumen de llenado mayor.
- Si es necesario, seque las placas con las tapas retiradas y el agar orientado hacia abajo entre 25 °C y 50 °C, o bien en una cabina de flujo laminar entre 15 y 30 minutos a 37 °C. Las placas no se deben secar en exceso y la pérdida de agua debe mantenerse al mínimo.
- Si las placas se van a almacenar, deben enfriarse antes de colocarlas en el refrigerador para evitar una condensación excesiva. Las placas no se deben secar antes del almacenamiento.

### 5. ¿Cómo debo almacenar los medios de cultivo una vez que se han preparado?

La vida útil óptima para las placas preparadas y los medios envasados deberá determinarse mediante análisis microbiológicos realizados en el momento de la preparación y durante el periodo de almacenamiento. Este estudio se debería realizar en cada laboratorio individual. Las prácticas recomendadas de laboratorio recomiendan establecer el tiempo de conservación de todos los medios preparados en función de las pruebas de rendimiento, así como colocar etiquetas con la fecha en los recipientes o soportes como corresponda. Solo se debe incubar un número adecuado de placas como prueba de esterilidad, y nunca el lote completo. Las placas empleadas para las pruebas de esterilidad se deben desechar. La pérdida de humedad de las placas de agar es una causa habitual de mal rendimiento microbiológico. Solo las placas claramente húmedas se deben secar antes de la inoculación.

### Placas de agar

La calidad de las placas preparadas puede deteriorarse tras la preparación. La tasa de deterioro variará en función de la estabilidad de los componentes del medio. También se verá afectada por los métodos de preparación, el almacenamiento y las fluctuaciones de temperatura.

El medio preparado se debe examinar antes de su uso para detectar contaminación, llenados irregulares, burbujas en la superficie del agar, cambios de color, hemólisis y signos de congelamiento o deshidratación como encogimiento, agrietamiento o pérdida de volumen. Todas las placas o frascos defectuosos se deben desechar.

Por lo general:

- Realice el almacenamiento entre 2 °C y 8 °C. Debe tenerse en cuenta la posición de almacenamiento en salas frías. Debe realizarse lejos de áreas con circulación de aire frío que provocarían que el medio se seque. Si se almacenan medios en un refrigerador estándar, no almacene las placas cerca del compartimento del congelador ni donde pueda producirse una congelación localizada.
- Almacene invertidos los medios de cultivo que están en placas (el medio en la parte superior y la tapa en la parte inferior) para evitar que la humedad alcance la superficie del agar.
- Envuelva las placas en una película de almacenamiento adecuada o colóquelas en recipientes sellados para evitar la pérdida de humedad.
- Las placas se deben almacenar a oscuras o bajo una luz artificial con una longitud de onda adecuada para evitar la fotooxidación.

Se recomiendan los siguientes periodos de vida útil para la mayoría de las placas de agar preparadas cuando se almacenan según lo descrito:

- Agar no selectivo, hasta cuatro semanas
- Agar sangre no selectivo, hasta siete días
- La mayor parte de los agares selectivos, hasta siete días



## Medios líquidos

Los caldos simples envasados y no selectivos, los diluyentes y los agares, una vez que se reconstituyen y esterilizan, pueden almacenarse en un entorno con una temperatura fría o ambiente, lejos de la luz, durante un máximo de seis meses. Los medios selectivos preparados no se deben almacenar durante más de tres semanas entre 2 °C y 8 °C. Algunos caldos selectivos son ligeramente más estables y pueden conservarse durante un máximo de tres meses si se almacenan a oscuras.

Póngase en contacto con su equipo de asistencia técnica local de expertos en microbiología para obtener más información sobre la preparación efectiva de medios de cultivo.

Más información en [thermofisher.com/microbiology](https://www.thermofisher.com/microbiology)

©2017 Thermo Fisher Scientific Inc. Reservados todos los derechos. Todas las marcas comerciales son propiedad de Thermo Fisher Scientific y sus filiales, salvo que se especifique lo contrario.

### Información de contacto:

Microbiología.sopORTE.es@thermofisher.com 993-260  
Internacional +44 (0) 1256 841144 LT2348A-ES  
España y Portugal +34 91 382 2023 Septiembre de 2017