
ESPECIFICACIÓN TÉCNICA

NC

ISO/TS 11133-1: 2012
(Publicada por la ISO en 2009)

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL—GUÍAS PARA LA PREPARACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO—PARTE 1: GUÍAS GENERALES EN EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO (ISO/TS 11133-1: 2009, IDT)

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

ICS: 07.100.30

1. Edición Diciembre 2012
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC-ISO/TS 11133-1: 2012

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Especificación Técnica:

- Ha sido elaborada, por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 61 de Microbiología, integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Ministerio de Salud Pública (UNSA-MINSAP)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
 - Laboratorio Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAGRI)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Laboratorio de Cuba-Control S.A. (MINCEX)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
 - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE- MINSAP)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP-MIP)
 - Laboratorio de Alimentación Social (CID-CI. MINCIN)
 - ALIMPORT (MINCEX)
 - Escuela de Hotelería y Turismo (MINTUR)
 - Universidad Agraria de La Habana (MES)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la Norma Internacional ISO 11133-1: 2009 *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.*
- Incluye los Anexos A, B y C informativos.

La NC-ISO/TS 11133:

- Consta de las siguientes partes bajo el título general - Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías para la preparación y producción de medios de cultivo:
 - Parte 1: Guías generales en el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio
 - Parte 2: Guías prácticas para las pruebas de desempeño de los medios de cultivo.

© NC, 2012

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, Vedado, Ciudad de La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

Introducción.....	4
1 Objeto	5
2 Referencias normativas	5
3 Términos y definiciones.....	5
4 Aseguramiento de la calidad de los medios de cultivo	10
4.1 Documentación	10
4.2 Almacenamiento	11
4.3 Preparación de medios en el laboratorio.....	13
4.4 Preparación para el uso	15
4.5 Descarte de los medios.....	16
5 Preservación y mantenimiento de las cepas control	16
5.1 General	17
5.2 Cepas control procedentes de fuentes comerciales	17
5.3 Banco de referencia preparado en el laboratorio	17
5.4 Cultivos de reserva	17
5.5 Cultivos de trabajo.....	17
6 Pruebas de desempeño de los medios de cultivo preparados.....	17
6.1 General	17
6.2 Control de calidad físico	18
6.3 Control de calidad microbiológico	18
Anexo B_(Informativo)	
Preparación del banco de referencia y cultivo de trabajo	21
Anexo C_(Informativo)	
Aseguramiento de calidad de los medios de cultivo— solución de problemas	23
Bibliografía.....	24

Introducción

En el laboratorio de microbiología, muchos ensayos y procedimientos dependen de que los medios de cultivo sean consistentes en sus propiedades y proporcionen resultados reproducibles. Los medios de cultivo se utilizan en todas las técnicas de cultivo tradicionales y también en muchas técnicas alternativas. Numerosas formulaciones de medios de cultivo deshidratados se encuentran comercialmente disponibles y muchas más, diseñadas para propósitos de crecimiento específico, se describen en la literatura. En los laboratorios donde se lleva a cabo el análisis microbiológico de los alimentos para consumo humano y animal, los principales objetivos son mantener, revitalizar, crecer, detectar y/o enumerar una amplia variedad de microorganismos. Los requerimientos para los medios de cultivo son específicos tanto para la muestra como para los organismos que se van a detectar. Los medios de cultivo deben reunir criterios establecidos o mínimos de desempeño que son un prerrequisito para cualquier trabajo microbiológico confiable. Debe realizarse un número suficiente de pruebas para demostrar i) la aceptabilidad de cada lote de medio, ii) que el medio es “adecuado al propósito”, y iii) que el medio puede producir resultados consistentes.

Estos tres criterios son una parte esencial de los procedimientos de control interno de la calidad y, con la documentación apropiada, permitirán un monitoreo efectivo de los medios de cultivo y contribuirán a la producción de datos exactos y precisos.

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL—GUÍAS PARA LA PREPARACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO—PARTE 1: GUÍAS GENERALES EN EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO

1 Objeto

Esta parte de la NC-ISO/TS 11133 ofrece la terminología general relacionada con el aseguramiento de la calidad y especifica los requisitos mínimos para la preparación de medios de cultivo, a usar para el análisis microbiológico de los productos destinados al consumo humano y animal.

Es también aplicable a los medios de cultivo a ser empleados para el análisis microbiológico de todos los tipos de aguas.

Estos requisitos se aplican a cuatro categorías de medios de cultivo usados en los laboratorios que preparan y/o utilizan medios de cultivo para realizar análisis microbiológicos:

- Medios listos para el uso producidos comercialmente;
- Medios para ser refundidos, suplementados y distribuidos;
- Medios preparados a partir de formulaciones deshidratadas disponibles comercialmente;
- Medios preparados a partir de sus componentes individuales.

2 Referencias normativas

Los documentos referidos son indispensables para la aplicación de este documento. Para las referencias fechadas, solamente aplica la edición citada. Para las referencias no fechadas, se aplica la última edición de la publicación referida (incluyendo cualquier enmienda).

ISO 7218:2007, *Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal – Requerimientos generales y guía para los exámenes microbiológicos.*

NC-ISO 11133-2:2012 *Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal – Parte 2: Guías prácticas para las pruebas de desempeño de los medios de cultivo.*

3 Términos y definiciones

Para los propósitos de este documento, se aplican los siguientes términos y definiciones.

3.1 General

3.1.1

control de calidad

(alimentos de consumo humano y animal) operaciones técnicas y actividades que se utilizan para satisfacer los requisitos para la calidad.

3.1.2

lote de medio de cultivo

unidad de un medio homogéneo y completamente trazable referente a una cantidad definida de granel, producto semielaborado o producto terminado, el cual es consistente en tipo y calidad y que ha cumplido con los requerimientos de producción (control de proceso) y la pruebas de desempeño, y el cual se ha producido dentro de un periodo de producción definido, habiéndole asignado el mismo número.

3.1.3

desempeño de los medios de cultivo

respuesta de un medio de cultivo al reto con organismos de prueba bajo condiciones definidas.

3.2 Medios de cultivo

3.2.1

medio de cultivo

formulación de sustancias, en forma líquida, semisólida o sólida, la cual contiene constituyentes naturales y/o sintéticos destinados a sostener la multiplicación (con o sin inhibición de determinados microorganismos), la identificación o la preservación de la viabilidad de los microorganismos

NOTA Cuando este término se emplea como parte de palabras compuestas, a menudo se abrevia a la palabra "medio" (ejemplo: medio de enriquecimiento)

3.2.2

medio definido químicamente

medio de cultivo compuesto solamente con constituyentes químicos de estructura molecular y grado de pureza conocidos.

3.2.3

medio no definido químicamente

medio parcialmente indefinido

medio de cultivo compuesto total o parcialmente de materiales naturales, procesados o que no tienen composición química completamente definida.

NOTA En el Anexo A se especifican designaciones armonizadas para diversos componentes no definidos químicamente que se usan en los medios de cultivo.

3.2.4

medio líquido

medio de cultivo que consiste en una solución acuosa de uno o más constituyentes

EJEMPLOS Agua de peptona, caldo nutriente.

NOTA 1 En algunos casos se adicionan partículas sólidas al medio de cultivo líquido.

NOTA 2 Los medios líquidos en tubos, frascos o botellas se denominan comúnmente "caldos".

3.2.5

medio sólido

medio semisólido

medio líquido que contiene sustancia solidificantes (ejemplo, agar-agar, gelatina) en diferentes concentraciones.

NOTA 1 Debido al amplio uso mundial de los medios solidificados con agar-agar, a menudo se emplea el término abreviado “agar” como sinónimo para medios sólidos y unido a otros sustantivos, ejemplo “agar para conteo en placa”.

NOTA 2 Los medios sólidos vertidos en placas de Petri son comúnmente denominados “placas”. Los medios sólidos vertidos en tubos o en frascos pequeños que se mantienen en posición de inclinada mientras el medio se solidifica a menudo se denominan “cuñas” o “inclinados”.

3.2.6

medio de transporte

medio diseñado para preservar y mantener la viabilidad de los microorganismos sin que se permita una multiplicación significativa en el periodo de tiempo entre la colección de la muestra y el procesamiento de la muestra en el laboratorio.

NOTA Los medios de transporte usualmente contienen sustancias que no permiten la multiplicación de los microorganismos, pero aseguran su conservación, ejemplo medio de transporte de Stuart o de Arnies.

3.2.7

medio de conservación

medio diseñado para mantener la viabilidad de los microorganismos en un largo periodo, para protegerlos de influencias adversas, las cuales pueden ocurrir durante un almacenamiento prolongado y permitir el recobrado después de este periodo

EJEMPLOS Medio de huevo de Dorset, cuñas de agar nutriente.

3.2.8

medio de suspensión

medio diseñado para separar microorganismos a partir de un producto de ensayo en una fase líquida sin multiplicación o inhibición durante el tiempo de contacto

EJEMPLO Solución salina peptonada.

NOTA 1 Los medios de suspensión se emplean también para preparar diluciones.

NOTA 2 Los medios de suspensión se denominan usualmente “diluentes”.

3.2.9

medio de recuperación

medio que permite a microorganismos dañados o estresados reparar y recuperar su capacidad de crecimiento normal sin promover necesariamente su multiplicación

EJEMPLO Agua de peptona buferada.

NOTA Este puede usarse también como medio de pre-enriquecimiento.

3.2.10

**medio de pre-enriquecimiento
medio de enriquecimiento**

Medio generalmente líquido que debido a su composición, ofrece condiciones particularmente favorables para la multiplicación de los microorganismos.

3.2.11

medio de enriquecimiento selectivo

medio de enriquecimiento que permite la multiplicación de microorganismos específicos mientras que inhibe total o parcialmente el crecimiento de otros microorganismos

EJEMPLO Medio Rappaport-Vassiliadis soya.

3.2.12

medio de enriquecimiento no selectivo

medio de enriquecimiento que permite la multiplicación de una amplia variedad de microorganismos

EJEMPLO Caldo nutriente.

3.2.13

medio de aislamiento

medio sólido o semi-sólido que permite la multiplicación de microorganismos

EJEMPLO Agar para conteo en placa.

3.2.14

medio de aislamiento selectivo

medio de aislamiento que permite el crecimiento de microorganismos específicos, y a su vez inhibe a otros microorganismos

EJEMPLO Agar XLD.

3.2.15

medio de aislamiento no selectivo

medio de aislamiento que no está diseñado para inhibir selectivamente a los microorganismos

EJEMPLO Agar para conteo en placa.

3.2.16

medio diferencial

medio de caracterización

Medio que permite el estudio de una o más características fisiológicas/bioquímicas de los microorganismos para su identificación

EJEMPLO Agar MacConkey.

NOTA Los medios diferenciales que pueden ser usados como medios de aislamientos son denominados como medios de aislamiento/diferenciales, ejemplo agar XLD, lactosa TTC.

3.2.17

medio de identificación

medio diseñado para producir una reacción de identificación específica la cual usualmente no requiere prueba confirmatoria ulterior.

EJEMPLO Agar Bilis esculina, agar TBX.

NOTA Los medios de identificación que pueden ser usados como medios de aislamiento se denominan como medios de aislamiento/identificación.

3.2.18

medio de enumeración

medios de cultivo selectivos o no selectivos que permiten cuantificar a los microorganismos

NOTA Un medio de enumeración puede incluir propiedades de un medio de recuperación y/o de un medio de enriquecimiento.

3.2.19

medio de confirmación

medio que contribuye parcial a totalmente a la identificación o a la caracterización de los microorganismos después de una etapa de recuperación preliminar, aislamiento y/o enriquecimiento.

EJEMPLO Agar Kligler.

3.2.20

medio para múltiples usos

medio asignado para varias categorías

EJEMPLO El agar sangre es un medio de recuperación de acuerdo con 3.2.9, un medio de aislamiento de acuerdo con 3.2.13 y un medio diferencial de acuerdo con 3.2.15 empleado para la detección de hemólisis.

3.2.21

medio listo para el uso

medio líquido, sólido o semi-sólido que se suministra en contenedores en forma lista para el uso o lista para el uso después de refundirlo.

EJEMPLOS Placas, tubos u otros contenedores:

- medio completo listo para el uso;
- medio para ser refundido, ejemplo: para uso en la técnica de placa vertida;
- medio para ser refundido y dispensado antes del uso, ejemplo: para ser vertido en placas de Petri;
- medio para ser refundido, suplementado y dispensado antes del uso, ejemplo: medio TSC, agar Baird Parker con RPF.

3.2.22

medio preparado a partir de formulaciones comerciales deshidratadas

medio deshidratado que requiere rehidratación y procesamiento previo al uso.

EJEMPLOS Polvos, gránulos, productos liofilizados, que resultan en uno o dos tipos de medios:

- un medio completo;
- un medio incompleto al cual se le añaden los suplementos antes del uso.

3.2.23

medio preparado a partir de componentes individuales

medio producido completamente a partir de la fórmula completa de sus ingredientes específicos.

3.3 Microorganismos de prueba

3.3.1

organismos de prueba

microorganismos usados generalmente para probar el desempeño de los medios de cultivo

NOTA Los organismos de prueba se definen posteriormente acorde a su origen (ver 3.3.2 a 3.3.5).

3.3.2

cepa de referencia

microorganismo obtenido directamente de una colección de un cultivo oficial y definido al menos a nivel de género y especie, en catálogo y descrito de acuerdo a sus características y preferiblemente obtenido de alimentos o agua.

3.3.3

banco de referencia

lote de cultivos idénticos separados obtenido en el laboratorio por un simple subcultivo a partir de una cepa de referencia obtenida en el laboratorio o a partir de un proveedor.

3.3.4

cultivo de reserva

subcultivo primario a partir de un banco de referencia

3.3.5

cultivo de trabajo

subcultivo a partir de un banco de referencia o de un cultivo de reserva o de un material de referencia, certificado o no.

NOTA El material de referencia es un material que contiene una cantidad de microorganismo viable en una concentración homogénea, estable. Un material de referencia certificado es un material de referencia para el cual la concentración está certificada.

4 Aseguramiento de la calidad de los medios de cultivo

4.1 Documentación

4.1.1 Documentación del fabricante o productor

Los siguientes detalles deben ser aportados por el fabricante o productor:

- nombre del medio, componentes individuales y cualquier suplemento y sus códigos del producto;
- número del lote;
- pH del medio completo;
- condiciones de almacenamiento y fecha de vencimiento;
- certificado del control de calidad y organismos de prueba usados;
- resultados de las pruebas de desempeño con los criterios de aceptación;
- hoja de datos técnicos;
- datos de seguridad y/o riesgos cuando sea necesario.

4.1.2 Aceptación de entrega de los productos

Para cada lote de producto (ingrediente o medio de cultivo), compruebe lo siguiente:

- identificación del producto;
- integridad del embalaje;
- fecha de vencimiento del producto;
- documentación suministrada.

Anote la fecha de recepción.

4.2 Almacenamiento

4.2.1 General

En todos los casos, siga las instrucciones del fabricante relacionadas con las condiciones de almacenamiento, fecha de vencimiento y uso.

4.2.2 Gestión y control de calidad para los medios deshidratados y los suplementos

Los medios se distribuyen como polvos deshidratados o en forma granulada en contenedores sellados. Los suplementos para la diferenciación selectiva o las sustancias de diagnóstico se suministran en estado líquido o liofilizado. Las compras deben planificarse para fomentar una rotación regular de la reserva (ejemplo, el primero que entra es el primero que se saca). Para

mantener un inventario eficaz es conveniente efectuar verificaciones complementarias que comprenden:

- comprobar el sello;
- anotar la fecha de la primera apertura;
- evaluación visual del contenido de los frascos abiertos.

Especialmente después de la apertura de un nuevo frasco, la calidad del medio puede depender del ambiente en que se almacene.

La pérdida de la calidad de los medios deshidratados se aprecia por cambio en las características de fluido del polvo, homogeneidad, apelmazamiento, cambios de color, etc. Cualquier medio deshidratado que haya absorbido humedad o muestre cambios obvios en su apariencia física deberá ser desechado.

4.2.3 Medios listos para el uso disponibles comercialmente

Siga las instrucciones del fabricante en relación con las condiciones de almacenamiento, la fecha de vencimiento y el uso.

4.2.4 Medios preparados en el laboratorio

La vida de anaquel de los medios varía. Las normas nacionales o internacionales pueden estipular condiciones específicas y vida de anaquel.

Almacene los medios bajo condiciones que prevengan cualquier modificación de su composición, protegidos de la luz y de la desecación y en un refrigerador a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, si es necesario. Generalmente se recomienda no exceder de 2 a 4 semanas el almacenamiento de las placas y de 3 a 6 meses los frascos y tubos, a menos que se especifique otra cosa en las normas o que los resultados de la validación del laboratorio de la vida de anaquel indiquen mayor tiempo de vida de anaquel.

Se recomienda que los medios, a los cuales se le han adicionado suplementos lábiles, deben usarse el día en que se preparan, a menos que se especifique otra cosa en las normas o que los resultados de la validación del laboratorio de la vida de anaquel indiquen mayor tiempo de vida de anaquel. Los medios sólidos que contienen sustancias químicamente reactivas y/o lábiles no deben almacenarse en frascos para refundirse.

Debe establecerse una fecha de vencimiento validada para los medios almacenados. Observe cualquier cambio de color, señal de evaporación/deshidratación o crecimiento microbiológico. Los lotes de medios que muestran tales cambios no deberán ser usados.

Previo al uso o antes de un calentamiento, se recomienda que los medios de cultivo se atemperen a la temperatura ambiente.

NOTA En 4.4.4. se ofrecen instrucciones especiales para el almacenamiento de los medios en placa.

4.3 Preparación de medios en el laboratorio

4.3.1 General

La preparación exacta de los medios de cultivo es uno de los pasos fundamentales en el examen microbiológico y se le deberá prestar especial cuidado.

Respete las buenas prácticas de laboratorio y cumpla las instrucciones del fabricante con respecto a la manipulación de los medios deshidratados y otros componentes, particularmente aquellos que contienen materiales peligrosos, ejemplo sales biliares u otros agentes selectivos.

Cuando los medios se preparan a partir de formulaciones comerciales deshidratadas, siga exactamente las instrucciones del fabricante. Documente todos los datos relevantes, ejemplo: masa/volumen, pH, fecha de preparación, condiciones de esterilización, operario.

Para los medios preparados a partir de componentes individuales, siga exactamente la receta y recoja todos los detalles y, además, todos los datos que identifican a la totalidad de los componentes usados (tales como: código y número de lote).

4.3.2 Agua

La conductividad del agua que se produce en el laboratorio no deberá ser mayor que $25 \mu\text{S cm}^{-1}$ (equivalente a una resistividad de $W 0,4 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a menos que se requiera otra cosa por diseño.

La contaminación microbiana no debe ser superior a 10^3 ml^{-1} y preferiblemente debe ser inferior a 10^2 ml^{-1} . Debe establecerse una verificación regular de la contaminación microbiológica de acuerdo con la ISO 6222^[1] (con una incubación a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ por $68 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$) o un método equivalente validado.

4.3.3 Pesada y rehidratación

Pese cuidadosamente la cantidad apropiada de medio deshidratado (tenga cuidado de no inhalar el polvo, especialmente con medios que contengan sustancias tóxicas) y mezcle progresivamente con la cantidad de agua requerida para evitar que se formen grumos.

4.3.4 Disolución y dispersión

Los medios deshidratados para su disolución necesitan una dispersión rápida mediante agitación inmediata y repetida o continua, seguido de un calentamiento, si es necesario. Los medios que contienen agar deben mantenerse en agua por algunos minutos antes de calentar con agitación para su disolución.

4.3.5 Medición y ajuste del pH

Mida el pH empleando un pH-metro y ajústelo antes de esterilizar, si es necesario, de forma tal que, después de la esterilización y el enfriamiento a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, el medio tenga el pH requerido dentro de $\pm 0,2$ unidades de pH, a menos que se declare de otra manera. El ajuste se realiza normalmente con una solución de hidróxido de sodio de aproximadamente 40 g/l [$c(\text{NaOH}) \approx 1$

mol/l) o con ácido clorhídrico diluido aproximadamente a 36,5 g/l [$c(\text{HCl}) \approx 1 \text{ mol/l}$]. Si el ajuste se realiza después de la esterilización, emplee una solución estéril.

NOTA Los medios comerciales pueden mostrar cambios significativos en el pH antes y después de esterilizar en autoclave. Sin embargo, siempre que se use un agua destilada o desionizada de buena calidad, el ajuste del pH previo a la esterilización en autoclave no es necesario.

4.3.6 Distribución

Dispense el medio en contenedores apropiados que tengan al menos un volumen del 20 % mayor que el del medio.

4.3.7 Esterilización

4.3.7.1 General

La esterilización de los medios de cultivo y de los reactivos generalmente se lleva a cabo mediante esterilización por calor húmedo (4.3.7.2) o esterilización por filtración (4.3.7.3).

Ciertos medios no necesitan esterilización en autoclave sino que pueden emplearse con posterioridad a su ebullición. Por ejemplo, los medios para *Enterobacteriaceae* que contienen verde brillante son particularmente sensibles al calor y a la luz y deben enfriarse rápidamente después de la ebullición y protegerse de la luz intensa. También, algunos reactivos pueden usarse sin esterilización (referirse a la norma nacional o internacional apropiada o a las instrucciones del fabricante).

4.3.7.2 Esterilización mediante calor húmedo

Ver ISO 7218

La esterilización por calor húmedo se realiza en el autoclave o en un aparato preparador de medios. Generalmente, la operación en el autoclave requiere 15 min a $121 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$. Para volúmenes superiores a 1 000 ml, adapte el ciclo de esterilización según sea necesario. En todos los casos, siga las instrucciones que se ofrecen en la Norma Nacional o Internacional o en las instrucciones del fabricante.

NOTA Cuando se procesan en un autoclave grandes volúmenes de medio (> 1 000 ml), puede ocurrir sobrecalentamiento. Ver ISO 7218.

Después del calentamiento es esencial que los medios se enfríen de forma tal que se evite el barboteo ni el reboso. Esto es particularmente importante para grandes volúmenes de medios o para medios sensibles, ejemplo: medios que contienen verde brillante.

4.3.7.3 Esterilización mediante filtración

La esterilización por filtración puede realizarse bajo condiciones de vacío o presurizadas. Utilice equipamiento estéril y membranas con un diámetro de poro de 0,2 μm . Esterilice las diferentes partes del aparato de filtración acorde a la ISO 7218 o use un equipamiento pre-esterilizado. Algunos filtros pueden retener proteínas u otras sustancias (tales como antibióticos). En este sentido para obtener la concentración adecuada, el usuario debe humedecer el filtro previamente.

4.3.7.4 Control

Después de esterilizar en autoclave, ebullición o filtrar, todos los medios deben ser controlados, en particular con respecto al pH, color, esterilidad y consistencia física.

4.3.8 Preparación de los suplementos

PRECAUCIÓN — Los suplementos comerciales que contienen agentes tóxicos, deberán manipularse con cuidado evitando la dispersión del polvo, el cual puede propiciar reacciones alérgicas u otras en el personal del laboratorio. Tome las precauciones adecuadas y siga las instrucciones del fabricante cuando prepare las soluciones.

No use suplementos comerciales más allá de su vida anaquel declarada, la cual para soluciones de trabajo de antibióticos, es generalmente el mismo día. Bajo determinadas circunstancias, las soluciones de antibióticos pueden conservarse congeladas en alícuotas apropiadas pero no deben volver a congelarse después de descongelarlas. La pérdida potencial de la actividad debido al congelamiento debe establecerse con el fabricante o debe ser determinado por el usuario.

4.4 Preparación para el uso

4.4.1 Fusión de los medios agarizados

Funda el medio de cultivo en un baño de agua hirviendo o mediante cualquier otro proceso que ofrezca idénticos resultados (por ejemplo, vapor fluyente en autoclave). Los medios que han sido esterilizados en autoclave previamente deben recalentarse por un tiempo mínimo para mantener el medio líquido. Evite el sobrecalentamiento y retire el medio cuando se haya fundido. Manténgalo a temperatura ambiente por un periodo corto, ejemplo, 2 min., para evitar que el cristal se rompa.

Enfríe el medio fundido en un rango de temperatura de 47 °C a 50 °C en un baño de agua controlado por un termostato. El tiempo que se requiere para alcanzar 47 °C a 50 °C depende del tipo de medio, el volumen y el número de unidades en el baño de agua. El medio fundido debe usarse tan pronto como sea posible, se recomienda no retenerlos por más de 4 h. El medio que no se use no deberá solidificarse otra vez para reutilizarlo nuevamente. En el caso de los medios particularmente sensibles, el tiempo de manipulación del medio fundido debe ser corto, como especifica la Norma relevante.

Establezca y documente un régimen de mantenimiento del agar colocando un termómetro dentro de un medio con agar en un contenedor separado, similar al que se use para el medio del ensayo.

Los medios para añadirse a la muestra deben atemperarse entre 44 °C y 47 °C, o como especifique la Norma Nacional o Internacional relevante.

4.4.2 De-aeración de los medios de cultivo

Si es necesario, justo antes del uso, caliente el medio de cultivo en agua hirviendo o bajo un flujo de vapor por 15 min. con los tapones o las tapas flojos, después del calentamiento, apriete las tapas y enfríe rápidamente hasta la temperatura de trabajo.

4.4.3 Adición de los suplementos

Los suplementos termolábiles deben adicionarse al medio después que estos se han enfriado a una temperatura de 47 °C a 50 °C. Permita que los suplementos estériles se atemperen antes de adicionarlos al medio con agar. Los líquidos fríos pueden provocar que se gelifique el agar o que se formen grumos transparentes. Mezcle todos los suplementos dentro del medio de forma suave y completa, entonces distribuya en los contenedores finales tan rápido como sea posible.

4.4.4 Preparación almacenamiento de los medios en las placas de Petri

Vierta el medio de cultivo con el agar fundido dentro de las placas de Petri de forma tal que se obtenga un espesor de al menos 3 mm (para placas de 90 mm de diámetro, normalmente se requieren de 18 ml a 20 ml de agar), o como especifique la Norma Nacional o Internacional relevante. Deje que el agar se enfríe y se solidifique colocando las placas tapadas en un lugar con una superficie horizontal y fresca. Si las placas se almacenan o si la incubación se prolonga más allá de 48 h, o si es por encima de 40 °C, se requiere más cantidad de agar.

NOTA Durante la incubación, ocurre pérdida de la humedad del medio que contiene agar, lo cual puede afectar el crecimiento de los microorganismos en algunas circunstancias. Los factores que influyen en la pérdida de agua son la composición del medio, la cantidad de medio en las placas, el tipo de incubadora, como las que tienen ventilador acoplado o de otro tipo, la humedad de la atmósfera en la incubadora, la posición y el número de placas en la incubadora y la temperatura de incubación.

Use el medio solidificado inmediatamente o almacénelo bajo condiciones que eviten que se modifique su composición, o sea en la oscuridad y/o en refrigerador a 5 °C ± 3 °C en bolsas selladas (ver 4.2). Rotule las placas en la base o en el lateral con la fecha de preparación, y/o de vencimiento e identifique el medio. Pueden usarse sistemas de codificación alternativa que contemplen estos requerimientos.

La vida de anaquel de las placas vertidas se incrementará si se almacenan en bolsas plásticas selladas. Para evitar que haya condensación, las placas se enfriarán antes de colocarlas dentro de las bolsas. No seque la superficie de las placas de agar previo almacenamiento en condiciones refrigeradas.

En general, para la inoculación en superficie de un medio sólido, seque las placas, preferiblemente con las tapas retiradas y con la superficie de agar hacia abajo, en un horno ajustado a una temperatura entre 25 °C y 50 °C o en un cabina de flujo laminar, hasta que las gotas de la superficie del medio hayan desaparecido. No las seque demasiado. Las placas de agar que se comercializan listas para el uso deben almacenarse y usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.5 Descarte de los medios

Tanto los medios contaminados como los no utilizados se eliminarán de forma segura y de acuerdo con las regulaciones locales o nacionales.

5 Preservación y mantenimiento de las cepas control

5.1 General

Existen algunos métodos disponibles, ejemplo liofilización, conservación en perlas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, o utilizando nitrógeno líquido, para la preservación exitosa y el mantenimiento de todos los microorganismos requeridos para la microbiología del agua y de los alimentos. Un método único podría no ser apropiado para todas las cepas.

En el Anexo B se ofrece un diagrama de flujo para el mantenimiento y la preservación.

5.2 Cepas control procedentes de fuentes comerciales

Si las cepas control se obtienen de colecciones de referencia o de suministradores comerciales con certificación de la ISO 9000[3] o con otra certificación adecuada y si estas se mantienen en sus contenedores originales, se deberán seguir las indicaciones del productor para su cultivo.

5.3 Banco de referencia preparado en el laboratorio

Los cultivos de reserva de las cepas de referencia (ver Cláusula B.1) para realizar pruebas de desempeño se mantendrán y manipularán de forma que se minimice la oportunidad para que ocurra contaminación cruzada, mutación o alteración de las características típicas. Los bancos de referencia deben almacenarse en alícuotas múltiples, usualmente en congelación profunda ($\leq -70\text{ }^{\circ}\text{C}$) o liofilizadas. A una temperatura superior, se reduce el tiempo de almacenamiento.

5.4 Cultivos de reserva

Los cultivos de reserva usualmente se preparan a partir de bancos de referencia liofilizados o en congelación profunda (ver Cláusula B.2). Las alícuotas deberán ser manipuladas de manera que se evite una posible contaminación cruzada del banco de referencia y/o su deterioro. Los cultivos de reserva deben prepararse resuspendiendo en un medio de crecimiento no selectivo e incubarse para obtener un cultivo en fase estacionaria. Para los sistemas de preservación comerciales, deberán seguirse rigurosamente las instrucciones del fabricante.

5.5 Cultivos de trabajo

Los cultivos de trabajo se preparan a partir de los cultivos de reserva o de referencia.

Los cultivos de trabajo no se usarán para preparar cepas de referencia, banco de referencia o cultivos de reserva.

6 Pruebas de desempeño de los medios de cultivo preparados

6.1 General

Los procedimientos para las pruebas de desempeño se especifican en la NC-ISO/TS 11133-2.

Los lineamientos mínimos se ofrecen en 6.2 y 6.3; en la práctica, los alimentos y el agua pueden contener microorganismos estresados. Debe tomarse en cuenta la capacidad del medio con respecto al recobrado de las células estresadas.

6.2 Control de calidad físico

Ver NC- ISO/TS 11133-2.

6.3 Control de calidad microbiológico

6.3.1 Contaminación

Debe examinarse la contaminación en una cantidad apropiada de cada lote.

6.3.2 Organismos de prueba

El conjunto de organismos de prueba debe contener microorganismos con características estables representativas de su especie y que hayan demostrado ser confiables para la demostración del desempeño óptimo de un medio particular preparado en el laboratorio. Los organismos de prueba deben principalmente incluir cepas ampliamente disponibles en colecciones de cultivos de referencia, pero cepas bien caracterizadas aisladas en el laboratorio podrían también ser incluidas.

Las características culturales relevantes del banco de referencia deben ser examinadas y registradas por el laboratorio o la selección de una nueva cepa si aparecen características atípicas. Es preferible usar cepas que se obtengan a partir de los alimentos o el agua, aunque no todas las colecciones de cultivos proveen de datos tales como el origen de la cepa.

Los microorganismos de prueba para cada medio deben incluir:

- cepas positivas robustas con características típicas;
- cepas débilmente positivas (esto quiere decir de una de naturaleza más sensible);
- cepas que muestren características negativas;
- cepas parcial o completamente inhibidas.

Los microorganismos de prueba disponibles se relacionan en la NC-ISO/TS 11133-2, Anexo B.

NOTA La referencia [6] describe una colección validada de cepas de prueba para evaluación de medios.

6.3.3 Medios y reactivos listos para el uso

Los productores de medios comerciales listos para el uso, especialmente si están acreditados por la NC-ISO 9000[3], deberán tener un programa de calidad propio y pueden emitir un certificado de calidad con los medios que ellos suministran. Bajo estas condiciones, el usuario puede no necesitar llevar a cabo numerosas pruebas en tales medios pero debe asegurar que las condiciones de almacenamiento se mantienen según lo recomendado por los productores. Para medios listos para el uso a los que se le adicionan suplementos, se recomienda al menos una prueba cualitativa.

6.3.4 Medios preparados a partir de formulaciones deshidratadas comerciales

Para medios de aislamiento y enumeración, al menos debe ejecutarse una prueba semi-cuantitativa.

Para medios de pruebas de caracterización, una prueba cualitativa podría ser suficiente. Las pruebas cuantitativas ofrecen mayor seguridad de la calidad de los medios.

Para aquellos medios que no contienen indicadores o agentes selectivos, es apropiado el uso de una única cepa de prueba positiva. Para aquellos medios que contienen indicadores o agentes selectivos, se utilizarán cepas las cuales demuestren la función del (de los) indicador (indicadores) y la selectividad. Para medios complejos, ejemplo con suplementos adicionados, cada lote debe ser verificado con cepas que tengan las características que se refieren en 6.3.2.

6.3.5 Medios preparados a partir de los componentes básicos

Se recomienda que, además de las pruebas cualitativas descritas en 6.3.4, se ejecuten pruebas cuantitativas para monitorear tendencias en la calidad de los materiales básicos, la productividad del medio y los procedimientos operacionales en el laboratorio.

Anexo A
(Informativo)

Designación de los componentes de los medios de cultivo en normas de análisis microbiológico de alimentos de consumo humano y animal

A.1 General

En las Cláusulas A.2 a A.5 se ofrece una descripción armonizada de varios componentes en la composición de los medios de cultivo en métodos normalizados microbiológicos

A.2 Peptonas

- Digerido enzimático de la caseína¹⁾
- Digerido enzimático de soya
- Digerido enzimático de tejido animal²⁾
- Digerido enzimático de corazón
- Digerido enzimático de gelatina
- Digerido enzimático de tejido animal y vegetal³⁾

A.3 Extractos

- Extracto de carne
- Extracto cerebro-corazón
- Extracto de levadura
- Bilis de buey para bacteriología
- Sales biliares
- Sales biliares No.3

A.4 Agar

- Agar bacteriológico

A.5 Otros

- Emulsión de yema de huevo
- Leche en polvo descremada
- Hidrolizado ácido de la caseína

¹⁾ Esto incluye digerido péptico de la caseína, digerido triptico de la caseína y triptona.

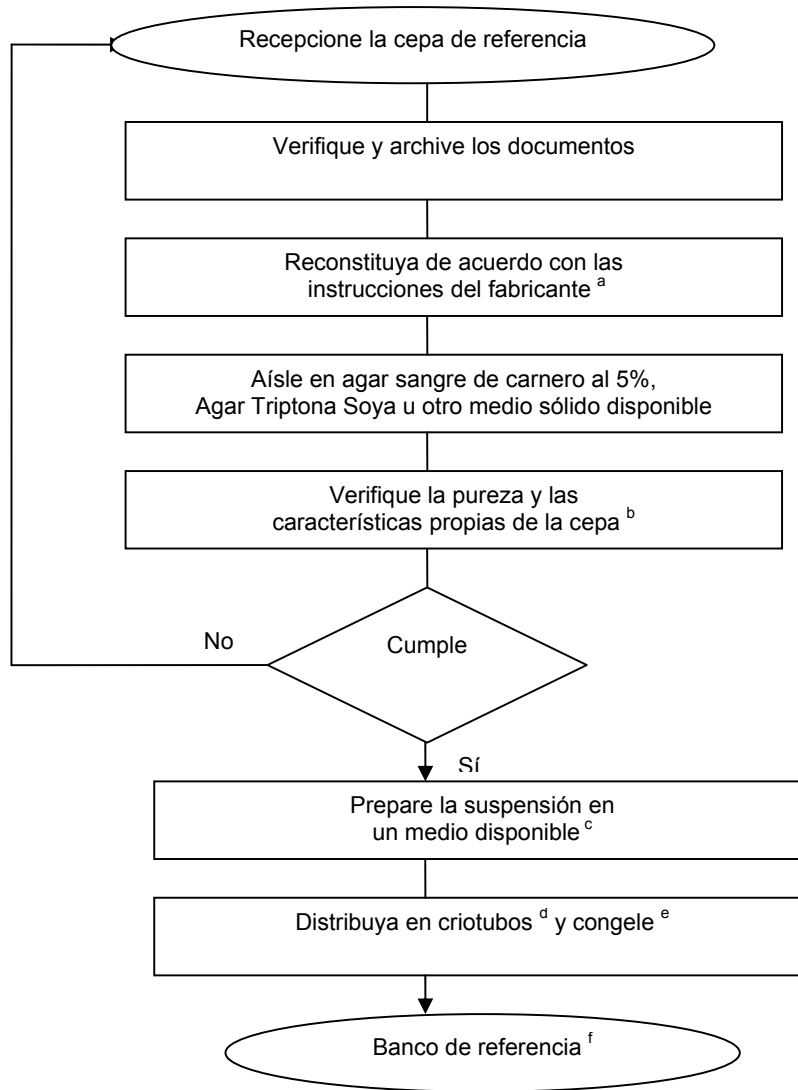
²⁾ Esto incluye peptona de carne, digerido péptico de carne, digerido pancreático de carne.

³⁾ Esto incluye triptosa.

Anexo B
(informativo)

Preparación del banco de referencia y cultivo de trabajo

B.1 Preparación del banco de referencia a partir de una cepa de referencia



^a En general, resuspensión en un caldo nutritivo y tiempo de contacto para resucitación.

^b Verifique la morfología de las colonias y tinción de Gram o identifique usando pruebas bioquímicas.

^c Por ejemplo, un medio crioprotector tal como el Caldo Triptona Soya suplementado con una fracción de volumen de glicerol al 10 % a 15 %.

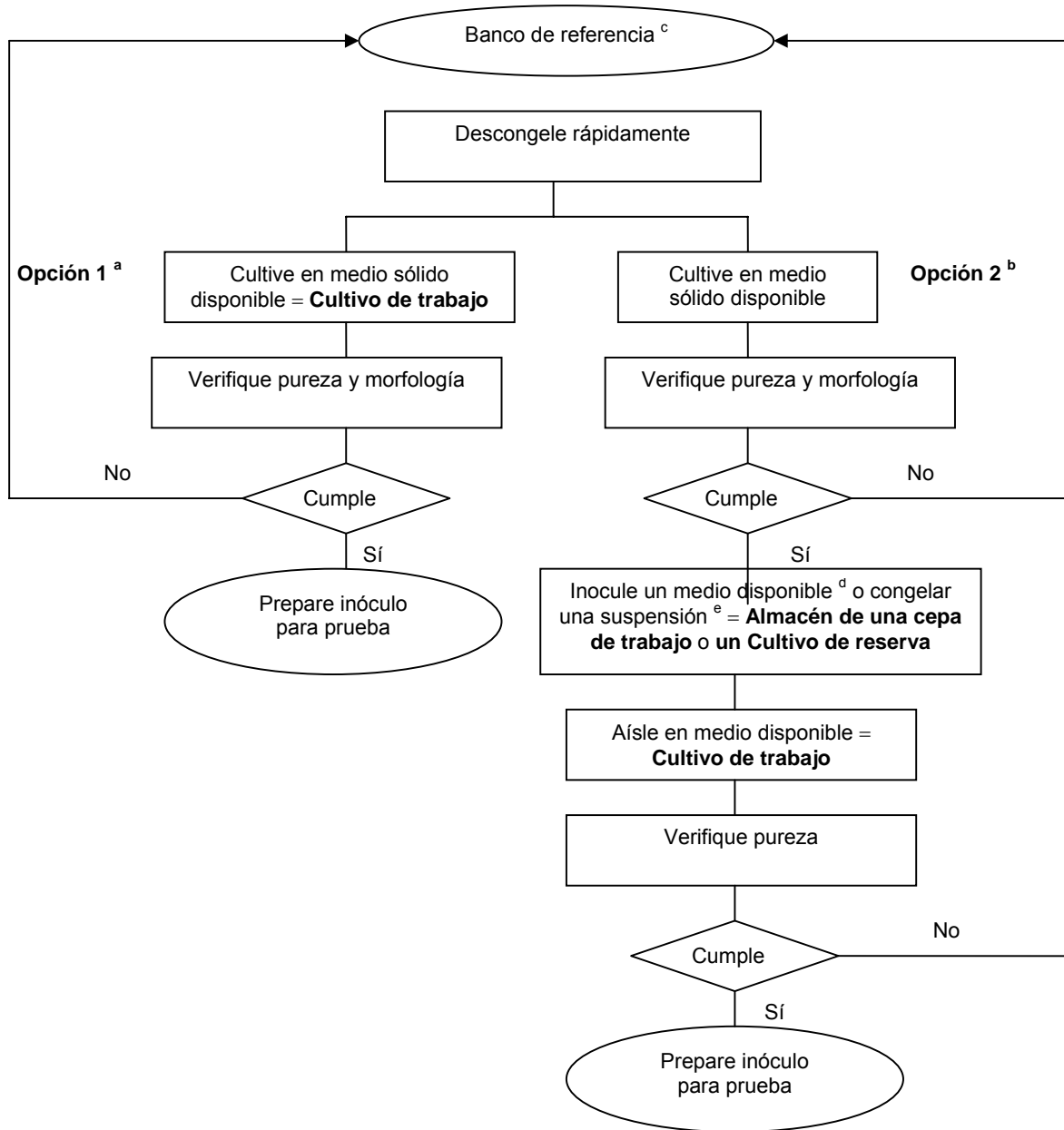
^d Los criotubos pueden contener perlas.

^e Congelando a temperaturas ≤ -70 °C es factible extender el almacenamiento. El almacenamiento a una temperatura superior lo limita.

^f Puede usarse como un cultivo de trabajo.

Fig B.1 Esquema de preparación del banco de referencia

B.2 Preparación del cultivo de trabajo a partir del banco de referencia



^a Este procedimiento es mejor.

^b Este procedimiento puede ser necesario para algunas cepas, ejemplo para pruebas cuantitativas. Documente todos los pasos.

^c Verifique y archive los documentos si la reserva de referencia se obtuvo de una fuente externa.

^d Por ejemplo, inocule un tubo de Agar Triptona Soya o Agar Sangre Triptona Soya u otro medio disponible, incube por 24 h y almacene a una temperatura disponible (18 °C a 25 °C ó 2 °C a 8 °C en dependencia de los microorganismos) por 4 semanas.

^e Por ejemplo, un medio crioprotector tal como el Caldo Triptona Soya suplementado con una fracción de volumen de glicerol del 10 % al 15 %. Congelando a temperaturas ≤ -70 °C es factible extender el almacenamiento. El almacenamiento a una temperatura superior lo limita.

Fig B.2 Esquema de preparación del cultivo de trabajo

Anexo C
(Informativo)

Aseguramiento de calidad de los medios de cultivo— Solución de problemas

Anomalía	Posible causa
Medio sólido que no solidifica	Sobrecalentamiento del medio durante la preparación pH bajo que provoca hidrólisis ácida Incorrecta pesada del agar empleado Agar no completamente disuelto Mezcla incorrecta de los ingredientes
pH incorrecto	Sobrecalentamiento del medio durante la preparación Baja calidad del agua Contaminación química externa pH medido a temperatura incorrecta pH-metro calibrado incorrectamente Baja calidad del medio deshidratado
Coloración anormal	Sobrecalentamiento del medio durante la preparación Baja calidad del agua Baja calidad del medio deshidratado pH incorrecto Contaminación externa
Formación de precipitados	Sobrecalentamiento del medio durante la preparación Baja calidad del agua Baja calidad del medio deshidratado Control incorrecto de pH Si la preparación es a partir de componentes individuales – impurezas en las materias primas
Medio inhibitorio/ Baja productividad	Sobrecalentamiento del medio durante la preparación Baja calidad del medio deshidratado Baja calidad del agua Uso de formulación incorrecta, ejemplo ingredientes pesados incorrectamente, suplementos añadidos en concentración errada Presencia de residuos tóxicos en los recipientes o en el agua de preparación
Pobre selectividad	Sobrecalentamiento del medio durante la preparación Baja calidad del medio deshidratado Uso de formulación incorrecta Suplementos adicionados incorrectamente, ejemplo cuando el medio está demasiado caliente o a concentración incorrecta Suplemento contaminado
Contaminación	Esterilización inadecuada Técnicas de asepsia pobres Suplemento contaminado

Bibliografía

- [1] ISO 6222, *Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*
- [2] ISO 8199, *Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*
- [3] NC-ISO 9000, *Quality management systems — Fundamentals and vocabulary*
- [4] EN 1659, *In vitro diagnostic systems — Culture media for microbiology — Terms and definitions*
- [5] EN 12322, *In vitro diagnostic medical devices — Culture media for microbiology — Performance criteria for culture media*
- [6] CORRY, J.E.L, CURTIS, G.D.W., BAIRD, R.M., editors. *Handbook of culture media for food microbiology*, 2nd edition. Elsevier, Amsterdam, 2003. 663 p. (*Progress in Industrial Microbiology*, Vol 37.)