	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIOLOGÍA	Código:
		PEO-AC-088-04
		Versión: 04
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024 Página 1 de 7

1. PROPÓSITO

Garantizar la aptitud de los medios de cultivo que se preparan en el Laboratorio de análisis microbiológico bajo condiciones específicas, para detectar los microorganismos presentes en las muestras que se analizan e identificar los microorganismos específicos de interés.

2. ALCANCE

Esta prueba tiene alcance sobre los medios de cultivo que se preparan en el Laboratorio de Microbiología que se especifican en éste procedimiento.

3. DOCUMENTOS RELACIONADOS

CÓDIGO	NOMBRE DEL DOCUMENTO
PEO-AC-085	Preparación de medios de cultivo y diluyentes

4. DEFINICIONES

Promoción: Término que hace mención a la acción y acto de promover. Refiere a iniciar o impulsar un proceso o una cosa.

Medios de cultivo no selectivos (generales): aquellos que permiten el desarrollo de una gran variedad de microorganismos.

Medios de cultivo selectivos: aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás.

Medios de cultivo diferenciales: aquellos en los que se ponen de relieve propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee.

5. RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

Responsabilidad

Auxiliares de Microbiología: Son los responsables de llevar a cabo lo descrito en éste procedimiento.

Jefe de Microbiología: Tiene la responsabilidad de velar por el cumplimiento de éste procedimiento.

Autoridad

Jefe de Microbiología: Tiene la autoridad de realizar cualquier cambio requerido en éste procedimiento.


6. CONTENIDO

6.1 Materiales

6.1.1 Agar Tripticasa Soya (CASO)

6.1.2 Agar Tripticasa Soya (CASO) con polisorbato y lecitina

Elaborado por: Jefe de Microbiología	Firma:	Fecha: 30/09/2022
Revisado por: Asistente de Documentación	Firma:	Fecha: 30/09/2022
Aprobado por: Gerente de Aseguramiento de Calidad	Firma:	Fecha: 30/09/2022

Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIOLOGÍA	Código: PEO-AC-088-04
		Versión: 04
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 2 de 7

- 6.1.3 Agar Sabouraud
- 6.1.4 Agar para recuento en placa
- 6.1.5 Agar nutritivo
- 6.1.6 Caldo Trypticase soya (CASO)
- 6.1.7 Caldo Tioglicolato
- 6.1.8 Caldo cloruro sódico peptona
- 6.1.9 Caldo Sabouraud Dextrosa 2%
- 6.1.10 Caldo MacConkey
- 6.1.11 Caldo Rappaport Vassiliadis
- 6.1.12 Caldo lactosa
- 6.1.13 Caldo bilis verde brillante (BRILA)
- 6.1.14 Agar Chromocult
- 6.1.15 Agar manitol sal
- 6.1.16 Agar cetrimida
- 6.1.17 Agar MacConkey
- 6.1.18 Agar XLD
- 6.1.19 Agar Eosina- Azul de metileno (EMB)
- 6.1.20 Solución amortiguada de fosfato pH 7.2
- 6.1.21 Pipeta de volumen fijo 100µl
- 6.1.22 Tips estériles para pipeta 2-200 µl
- 6.1.23 Cajas de Petri
- 6.1.24 Esparcidores celulares delta
- 6.1.25 Incubadora
- 6.1.26 Cepas ATCC de trabajo de los siguientes microorganismos:
 - a. Staphylococcus aureus ATCC 6538
 - b. Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
 - c. Candida albicans ATCC 10231
 - d. Aspergillus brasiliensis ATCC 16404
 - e. Clostridium sporogenes ATCC 19404
 - f. Escherichia coli ATCC 8739
 - g. Salmonella enterica subesp. enterica serovar typhimurium ATCC14028


6.2 Frecuencia

La prueba de promoción de crecimiento de los medios de cultivo debe realizarse al cambiar el número de lote del fabricante.

6.3 Procedimiento

6.3.1 Inóculo:

- 6.3.1.1 El inóculo que se utiliza para la prueba de promoción de crecimiento debe corresponder a no más de cinco pasajes desde el cultivo madre original.

	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIOLOGÍA	Código: PEO-AC-088-04
		Versión: 04
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 3 de 7

6.3.1.2 Para la preparación del inóculo deben realizarse las diluciones necesarias de los microorganismos utilizando solución amortiguada de fosfatos de pH 7.2 estéril de manera que cada medio de cultivo se inocule con no más de 100 UFC.

6.3.1.3 Para suspender esporas de *Aspergillus brasiliensis*, se puede añadir 0.05% de polisorbato 80 a la solución amortiguadora.

6.3.1.4 Las suspensiones de microorganismos deben utilizarse en un período de 2 horas o dentro de 24 horas si se almacenan a una temperatura de 2-8° C.

6.3.2 Medios de cultivo sólidos no selectivos:

6.3.2.1 Inocular placas/porciones de los medios de cultivo con no más de 100 UFC de los microorganismos indicados en la **Tabla 1**, empleando una porción/placa individual de medio para cada uno.

6.3.2.2 Debe prepararse un control negativo del medio de cultivo que se evalúa, en el cual no debe observarse crecimiento de microorganismos.

6.3.2.3 Para la prueba de promoción de crecimiento y de las propiedades inhibitorias de los medios selectivos se utiliza el método de extensión en superficie inoculando cada una de las placas con no más de 100 UFC del microorganismo adecuado.

6.3.2.4 La extensión en superficies se realiza mediante el uso de un esparcidor de células delta desechable. Una cantidad adecuada de inóculo es 0.1 ml por lo que la cantidad de microorganismos debe ajustarse a éste volumen.

6.3.2.5 El esparcidor debe ponerse en contacto con el inóculo en la superficie de la placa con agar, aplicar una presión moderada y distribuirlo uniformemente.


6.3.2.6 Dejar que el inóculo sea absorbido por el agar de 10 a 20 minutos, y luego invertir e incubar bajo las condiciones descritas en la **Tabla 1**.

6.3.3 Medios de cultivo sólidos selectivos/diferenciales:

6.3.3.1 Verificar las propiedades adecuadas de estos medios de cultivo según se indica en la **Tabla 2**; inoculando cada uno de ellos con no más de 100 UFC de los microorganismos, empleando una porción/placa individual de medio para cada uno.

6.3.3.2 Debe prepararse un control negativo de cada medio de cultivo que se evalúa, en el cual no debe observarse crecimiento de microorganismos.

6.3.3.3 Para la prueba de promoción de crecimiento, de las propiedades inhibitorias y de las propiedades indicadoras de los medios selectivos se utiliza el método de extensión en

	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIOLOGÍA	Código:
		PEO-AC-088-04
		Versión: 04
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024 Página 4 de 7

superficie inoculando cada una de las placas con no más de 100 UFC del microorganismo adecuado (ver numerales 6.3.2.4 al 6.3.2.6); incubar a la temperatura y tiempo especificados en la **Tabla 2**.

6.3.4 Medios de cultivo líquidos:

6.3.4.1 Inocular porciones de los medios líquidos (100 ml) con no más de 100 UFC de los microorganismos indicados en la **Tabla 3** e incubar bajo las condiciones especificadas.

6.4 Interpretación de resultados

6.4.1 Para medios sólidos que se utilizan en pruebas cuantitativas (medios no selectivos), el crecimiento obtenido no debe diferir en un factor mayor de 2 a partir del valor calculado para el inóculo que no debe ser no mayor de 100 UFC (recuperación de 50-200%).

6.4.2 Los medios líquidos son adecuados si se produce un crecimiento claramente visible de los microorganismos (turbidez). En este caso es necesario trasladar una porción del caldo a un medio selectivo o diferencial para el microorganismo inoculado y de ésta manera comprobar su presencia el medio de cultivo líquido.

6.4.3 En los medios de cultivo selectivos deben obtenerse colonias comparables en apariencia y reacciones indicadoras a aquellas que se han obtenido anteriormente con ellos. En cuanto a las propiedades inhibitorias, deben inhibir el crecimiento de los microorganismos de prueba.

6.4.4 En cualquier caso el crecimiento obtenido con estos medios debe ser comparable al obtenido anteriormente con una partida de medio analizada y aprobada previamente.

6.5 Reporte de resultados

Los resultados se registran en el formulario **FO-AC-117 Reporte de prueba de promoción de crecimiento en medios de cultivo**.


7. REVISIÓN DE ESTE DOCUMENTO

El presente documento deberá revisarse antes del 30/09/2024 o antes de su vencimiento si fuere necesario.

8. BIBLIOGRAFÍA

Farmacopea de los Estados Unidos de América 2012 (USP 40). <61> Examen microbiológico de productos no estériles: Pruebas de recuento microbiano; <62> Examen microbiológico de productos no estériles: Prueba de microorganismos específicos; <71> Pruebas de esterilidad.

Anexo 2, Informe 45 OMS. WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories. Microbiology Manual. Merck. 12th Edition.

	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIOLOGÍA	Código:
		PEO-AC-088-04
		Versión: 04
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024 Página 5 de 7

9. ARCHIVO

El presente documento original será archivado en Gestión de Calidad bajo condiciones de seguridad adecuadas, además, se emiten 2 copias controladas para el área de Aseguramiento de Calidad siendo los responsables Asistente de Documentación y Jefe de Microbiología.

10. ANEXOS

CÓDIGO	NOMBRE
A-AC-001	Marcha de identificación microbiana

Tabla 1. Promoción de crecimiento medios sólidos no selectivos

Medios de cultivo sólidos no selectivos		
Medio de cultivo	Cepa de prueba	Inóculo / Condiciones de incubación
Agar tripticasa soya y Agar tripticasa soya con polisorbato y lecitina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	≤ 100 UFC 20-25° C ≤ 5 días
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	≤ 100 UFC 20-25° C ≤ 5 días
Agar Sabouraud dextrosa	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días ≤ 100 UFC 20-25° C ≤ 5 días
Agar para recuento en placa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
Agar nutritivo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días


Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIOLOGÍA	Código: PEO-AC-088-04
		Versión: 04
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 6 de 7

Tabla 2. Prueba de crecimiento/ propiedades indicadora e inhibitoria en medios sólidos selectivos

Medios de cultivo sólidos selectivos / diferenciales			
Medio de cultivo	Propiedad	Cepa de prueba	Inóculo/ Condiciones de incubación
Agar MacConkey	PC + I	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	PC + I	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> ATCC14028	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
Agar cetrimida	PC In	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
Agar manitol sal	PC+I In	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
Agar Chromocult	PC + I	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
Agar eosina – azul de metileno	PC + I	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días


PC = Promoción de crecimiento

I= Propiedad indicadora

In= Propiedad inhibitoria

Tabla 3. Prueba de crecimiento/ propiedades indicadora e inhibitoria en medios líquidos selectivos y no selectivos

Medios de cultivo líquidos		
Medio de cultivo	Cepa de prueba	Inóculo / Condiciones de incubación
Caldo tripticasa soya	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	≤ 100 UFC 20-25° C ≤ 5 días
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	≤ 100 UFC 20-25° C ≤ 3 días
Caldo tioglicolato	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
Caldo lactosa	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> ATCC14028	
Caldo cloruro sódico peptona	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
Caldo bilis verde brillante	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
Caldo Sabouraud Dextrosa 2%	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	100 UFC 20-25° C ≤ 5 días
Caldo Rappaport Vassiliadis	<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> ATCC14028	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días
	Propiedad inhibitoria: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	
Caldo MacConkey	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 Propiedad inhibitoria: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	≤ 100 UFC 30-35° C ≤ 3 días

Laboratorios Bonin 	PROCEDIMIENTO ESTÁNDAR DE OPERACIÓN PRUEBA DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIOLOGÍA	Código: PEO-AC-088-04
		Versión: 04
		Vigencia: 30/09/2022 Vencimiento: 30/09/2024
		Página 7 de 7

11. CONTROL DE REGISTROS

CODIGO Y NOMBRE DEL REGISTRO	RESPONSABLE DE SU ARCHIVO	MODO DE INDIZACION Y ARCHIVO	ACCESO AUTORIZADO	TIEMPO DE CONSERVACION
FO-AC-117 Reporte de prueba de promoción de crecimiento en medios de cultivo.	Jefe de Microbiología	NA	Personal del laboratorio de Microbiología	3 años

12. CAMBIOS EN EL DOCUMENTO

Versión	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO
1	<p>En 6.1. Materiales se agregaron los siguientes medios de cultivo: Caldo cloruro sódico peptona, Caldo Sabouraud y Caldo MacConkey; se elimina el caldo peptona de caseína-lecitina-polisorbato; se cambia la solución amortiguadora de cloruro de sodio-peptona pH 7 por Solución amortiguada de fosfato pH 7.2. Se agrega también pipeta de volumen fijo de 100µl y tips de 2-200 µl para ésta pipeta.</p> <p>En 6.1.24 se elimina el <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 de las cepas de prueba al igual que en la tabla No. 3 Promoción de crecimiento en medios líquidos (caldo tripticasa soya).</p>
2	<p>En el numeral 6.1 Materiales se agrega el medio de cultivo Agar Tripticasa soya (CASO) con polisorbato y lecitina</p> <p>Se agregan los caldos Sabouraud Dextrosa 2%, Rappaport Vassiliadis y MacConkey en la Tabla No. 3.</p> <p>Se eliminan los numerales 6.3.3.4 al 6.3.3.7 haciendo referencia a los numerales 6.3.2.4 al 6.3.2.6.</p>
3	<p>Se cambia la referencia bibliográfica de la USP (USP 35 a USP 40) y se agrega como referencia el Manual de Microbiología Merck.</p> <p>Se elimina de la Tabla 1 el agar sangre de los medios de cultivo que se utilizan en el laboratorio y se agrega el <i>Staphylococcus aureus</i> como microorganismo de prueba para dos medios de cultivo.</p> <p>Se cambia el nombre de la Tabla 3 de Promoción de crecimiento en medios líquidos a Prueba de crecimiento/ propiedades indicadora e inhibitoria en medios líquidos selectivos y no selectivos y en ésta se agregan microorganismos de prueba para algunos medios de cultivo.</p>