

Verificación de la carga microbiana en los “Culti-Loops”

Mario Morote^{1,*}, Lourdes Zegarra¹, Carla Bernal²

¹ Planta de Producción de Radioisótopos, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

² Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú

Resumen

Se utilizaron 6 cepas microbianas denominadas “Culti-loops” (*A. brasiliensis*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*) para verificar la eficiencia de los medios de cultivo, sin embargo, la USP indica utilizar menos de 100 ufc/cepa, para lograrlo se han realizado diluciones crecientes para cada cepa y de acuerdo con los resultados obtenidos esto fue aumentando desde 1×10^4 hasta 30×10^6 ufc/cepa y mediante cálculos realizados se determinaron volúmenes (μL) que fueron sembradas en medio de cultivo para cada uno de los microorganismos indicados. Se determinaron valores prácticos y de acuerdo con los resultados se obtuvieron para cada cepa un valor de dilución menor a 100 ufc.

Abstract

Six microbial strains called "Culti-loops" (*A. brasiliensis*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. coli*) were used to verify the efficiency of the culture media, however, USP indicates to use less than 100 cfu / strain; to achieve it increasing dilutions were performed for each strain and according to the obtained results that grew from 1×10^4 to 30×10^6 cfu / strain and by means of calculation, volumes were determined (μL), seeded in culture medium for each of the listed microorganisms. Practical values were determined and according to the results, a dilution value of less than 100 cfu was obtained for each strain.

1. Introducción

La Planta de Producción de Radioisótopos (PPRR) del IPEN produce Radiofármacos de aplicación parenteral para el diagnóstico y terapia en medicina nuclear. Antes de su comercialización cada lote pasa por diversos controles, entre ellos el control de esterilidad que se realiza con medios de cultivo que se elaboran en la PPRR a partir de formulaciones preparadas comercialmente, como los caldos Tripticasa Soya Caseína (CCAS) y Tioglicolato (CTIO). También se verifica la eficiencia de cada medio de cultivo mediante el sembrado de cepas microbianas certificadas ATCC (American Type Culture Collection) en una cantidad no mayor de 100 ufc (unidad formadora de colonia), recomendada por la Farmacopea Americana (USP) [1], a esta actividad se le denomina Prueba de Promoción de crecimiento microbiano de Medios de Cultivo.

La cepa microbiana de referencia es un material biológico con certificado ATCC, es decir un cultivo puro, definido por lo menos a nivel de género y especie, catalogado, caracterizado y de origen conocido.

Esta cepa tiene el nombre comercial de

“Culti-Loops” que son asas de inoculación o “loop” desechables, Figura 1, tiene en un extremo los microorganismos viables y estabilizados y contiene cantidades mayores de 10 000 ufc, por tal motivo no se puede sembrar directamente al medio de cultivo, por lo que no cumple con lo indicado por la USP.

En este trabajo se ha logrado optimizar las 6 cepas “Culti-Loops” mediante diluciones para obtener un volumen que contenga cantidades no mayores de 100 ufc.



Figura 1. Asa de inoculación o Loop.

2. Desarrollo experimental

2.1 Materiales y equipos

- Cepa microbiológica (Material biológico de referencia certificado)

Aspergillus brasiliensis ATCC 16404

* Correspondencia autor: mmorote@ipen.gob.pe

<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739

- Medios de Cultivos

Agar Tripticasa Soya Caseina (ACAS)
 Agar Sabouraud (ASAB)
 Agar Mc Conkey (AMAC)
 Caldo Tioglicolato (CTIO)
 Caldo Tripticasa Soya Caseina (CCAS)

- Equipos de Laboratorio

Incubadoras $32,5 \pm 2,5$ °C y $22,5 \pm 2,5$ °C
 Vortex y Refrigeradora

2.2 Metodología

El método utilizado es a través de diluciones de las 6 cepas, cada una contiene mayor de 10 000 ufc/cepa (valor teórico) de acuerdo con lo declarado en el certificado. Como el objetivo es obtener un volumen de cepa no mayor a 100 ufc, el trabajo se divide en 2 etapas.

La primera etapa, se inicia asumiendo que la cepa tiene el valor teórico, para ello se sostiene la cepa o asa de inoculación, Figura 2 y se corta el extremo donde está localizada

la cepa y se sumerge al primer vial que contiene 5 mL de suero fisiológico (SF), es decir tiene 2 000 ufc/ mL, Figura 3, se agita por 2 minutos y se extrae 1 mL que se vierte a un segundo vial con 4 mL de SF, es decir tiene 500 ufc/ mL, Figura 4, luego se agita por 30 segundos y se extraen 3 volúmenes diferentes de 50, 100 y 200 μ L, Figura 5; cada volumen se siembra en 3 placas de Petri con agar y 3 tubos con el tipo de caldo que le corresponde a la cepa, Figuras 6, 7 y 8 y se incuban por 3 a 5 días de acuerdo con el tipo de cepa microbiana, Figura 9, y finalmente se realiza la lectura de colonias en las placas (valor obtenido) y crecimiento en los tubos (verificación de crecimiento microbiano), graficados en las Figuras 10 y 11.

La segunda etapa, se realiza el cálculo de diluciones mediante regla de tres simple, sobre la base del resultado del valor obtenido o cantidad de colonias que se obtuvo en la primera etapa; es decir, si en 100 μ L se obtuvo después de la incubación 200 ufc en placa, la cepa contiene 40 000 ufc. A partir de este valor se realiza los cálculos siguiendo la metodología de la primera etapa hasta lograr por triplicado un volumen de cepa que obtenga menos de 100 ufc/placa.



Figura 2. Asa de inoculación y 1° vial con SF.



Figura 3. Corte del extremo y sumergido al 1° vial.

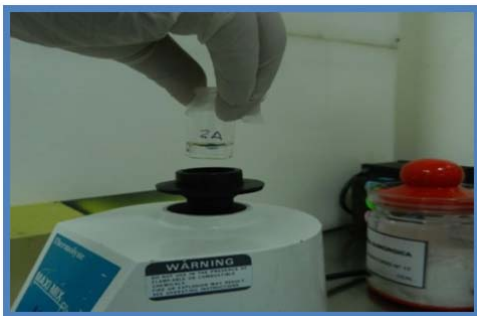


Figura 4. Alícuota del 1° vial al 2° vial con SF.



Figura 5. Extracción de alícuota de 2° vial.



Figura 6. Volúmenes de dilución de cepa a placa Petri.



Figura 7. Llenado de placas con medio de cultivo.



Figura 8. Volúmenes de cepa a tubos de ensayo.



Figura 9. Incubación de placas y tubos de ensayo.

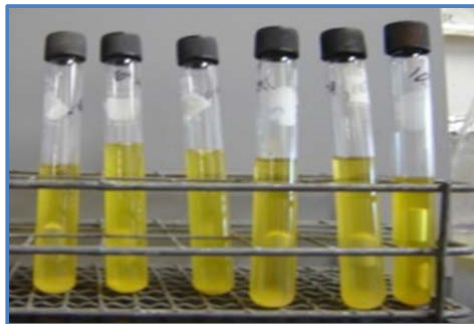


Figura 10. Crecimiento de la cepa en caldo.



Figura 11. Lectura de microorganismos por placa.

3. Resultados

- De acuerdo con los resultados obtenidos en la primera etapa se ha logrado determinar los valores para las seis cepas, Tabla 1.
- Sobre la base de los valores obtenidos se determinaron las diluciones de la cepa que deben realizarse y los volúmenes de siembra a los medios de cultivo, Tabla 1 y Figura 12.
- Los volúmenes sembrados en placa con medios de cultivo, dieron como resultado para las 6 cepas cantidades entre 34 a 88 de ufc/placa, valores que están dentro de lo especificado (menos de 100 ufc/placa) Tabla 1.

4. Conclusiones

- Se han determinado para cada cepa microbiana las diluciones y volumen de siembra, descrita en la Tabla 1.
- Por los resultados obtenidos se pudo observar que cada cepa presenta una cantidad diferente de microorganismos (valor obtenido), respecto a su carga inicial (valor teórico).
- El sembrado de volúmenes obtenidos de cada cepa, tanto en placas para conseguir una cuantificación de colonias (ufc/placa), como en tubos con caldo para el crecimiento microbiano es el más adecuado.

– Los volúmenes obtenidos de las 6 cepas cumplen con la USP, ya que se lograron recuentos microbianos en placa menores de 100 ufc, Figura 12.

5. Recomendaciones

- Se debe verificar la reproducibilidad de los resultados de la Tabla 1 de manera cuantitativa mediante inoculación de la cepa en placa, cada vez que se realice la prueba de promoción de crecimiento microbiano para

cada lote elaborado de medios de cultivo sólidos, no aplica para caldos.

- Cuando se utilice una cepa de otro lote de *Culti - Loop*, se debe seguir la primera etapa de la metodología y sobre la base de esta realizar cálculos de dilución hasta lograr menos de 100 ufc por placa.

6. Referencia

[1]. U.S. Pharmacopeial Convention. USP 38 Prueba de promoción del crecimiento de microorganismos. Cap. 71, pp. 136.

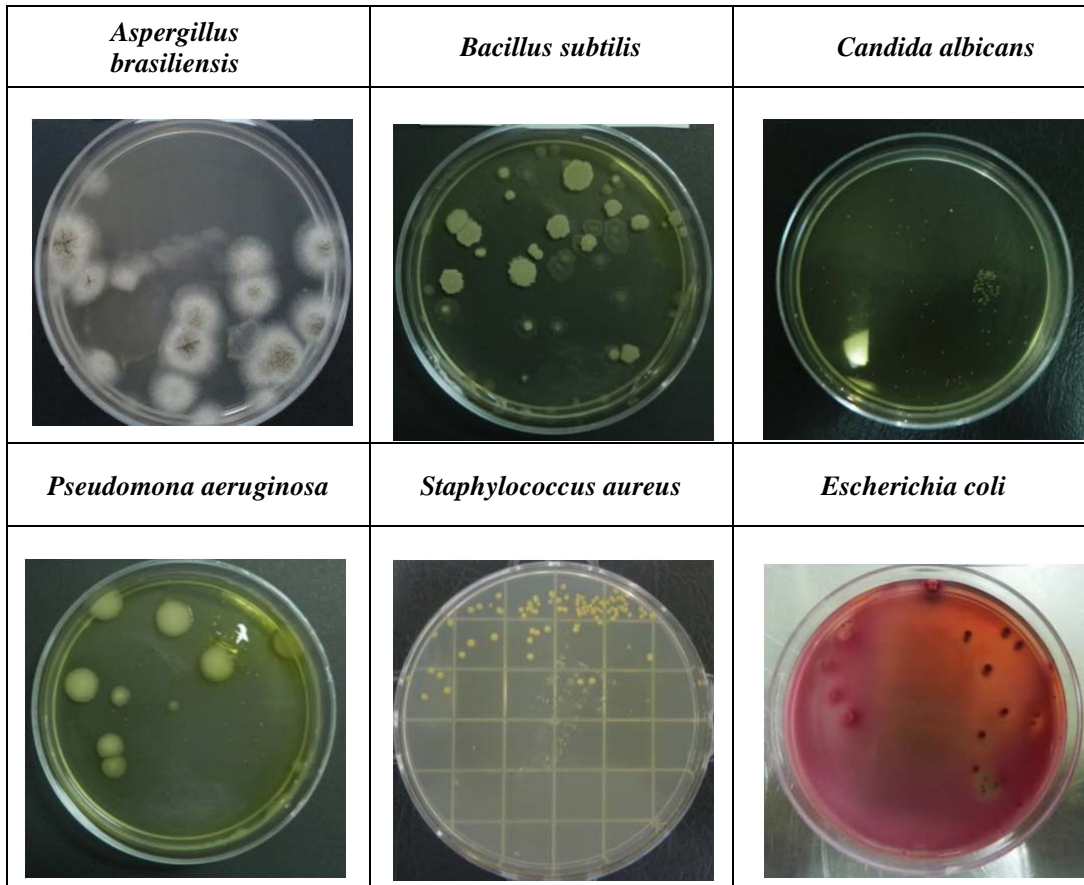


Figura 12. ufc por placa de las 6 cepas microbianas.

Tabla 1. Resumen de resultado final para cada cepa microbiana.

Nº Prueba	Descripción de la Cepa			Valor Obtenido (ufc/cepa)	Dilución		Volumen de siembra (µL)	Incubación (°C)	Recuento de ufc/placa
	Nombre	Valor Teórico	Presentación		1º vial	2º vial			
1	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404	> 10 000	Culti-Loops (asa)	10 000	cepa + 2 mL SF	-----	40	22.5 ± 2.5	60
2	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	> 10 000	Culti-Loops (asa)	500 000	cepa + 5 mL SF	100 µL de 1º diluc + 4 mL SF	10	22.5 ± 2.5	88
3	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	> 10 000	Culti-Loops (asa)	1 000 000	cepa + 5 mL SF	100 µL de 1º diluc + 4 mL SF	10	32.5 ± 2.5	78
4	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	> 10 000	Culti-Loops (asa)	30 000 000	cepa + 10 mL SF	10 µL de 1º diluc + 10 mL SF	10	32.5 ± 2.5	51
5	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	> 10 000	Culti-Loops (asa)	1 000 000	cepa + 5 mL SF	10 µL de 1º diluc + 4 mL SF	15	32.5 ± 2.5	86
6	<i>E. coli</i> ATCC 8739	> 10 000	Culti-Loops (asa)	100 000	cepa + 5 mL SF	100 µL de 1º diluc + 4 mL SF	100	36 ± 2	34