

Agar RPMI 1640 con 2% Glucosa (ref. 285-295)

REF 285-295

2



12

IVD Material para Diagnóstico *In Vitro*

Presentación:

Medio de cultivo listo para su uso, estuche de 10 unidades, Placas de 90mm. (ref. 285-295).

Composición (gramos / litro):

Base nutritiva RPMI 1640 sin bicarbonato	10.40
MOPS	34.53
D- (+) Glucosa	20.00
Agar bacteriológico	15.00
pH final medio de cultivo listo para el uso	7.0 +/- 0.1

Descripción:

Las infecciones fúngicas, especialmente las infecciones invasoras causadas por levaduras del género *Candida*, tienen gran importancia clínica por los diversos riesgos y decisiones terapéuticas asociados al manejo de pacientes hospitalizados. La vigilancia de la susceptibilidad a los antifúngicos adquiere relevancia debido a la creciente aparición de resistencia al tratamiento con antifúngicos.

El Agar RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato, suplementado con 2% de glucosa, corresponde a la fórmula recomendada por el CLSI para el estudio cuantitativo de susceptibilidad (mediante gradientes de concentración) de levaduras del género *Candida* y otras, frente a antifúngicos mediante método de difusión en agar, especialmente para las cepas resistentes a la Anfotericina B. El Agar RPMI 1640 es además una alternativa para el método de determinación cuantitativa de la susceptibilidad mediante técnica de dilución en pocillos.

El estudio de la susceptibilidad del género *Candida* frente a los antifúngicos mediante difusión utilizando tiras de gradientes de concentración se realiza sobre placas de Agar RPMI inoculadas con una suspensión calibrada de levaduras. Tras 24 a 48 horas de incubación a 35°C se genera una elipse de inhibición del desarrollo que permite determinar la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima del antifúngico).

En esta fórmula, la glucosa proporciona una fuente de energía que facilita el desarrollo de las levaduras, y el RPMI 1640 constituye el aporte de nutrientes esenciales.

Materiales y Reactivos necesarios, pero no suministrados:

Tiras de antifúngicos con gradiente de concentración.
Standard de McFarland 0.5 y 1.0
Suero fisiológico estéril
Estufa de cultivo

PRECAUCIONES PARA SU USO ADECUADO:

- Material para uso diagnóstico IN VITRO
- Solo para uso profesional. Requiere usuarios con capacitación previa.
- NO INGERIR EL PRODUCTO, NO INHALAR EL PRODUCTO
- No debe ser usado como materia prima para ninguna otra fabricación.
- No debe usarse pasado su fecha de expiración.
- No debe usarse si el envase está deteriorado. Material garantizado solo con sellos intactos.
- No debe usarse si se observa contaminación bacteriana.
- Temperar la placa sin sello antes de su uso. No utilizar con condensación excesiva. No resellar.
- Debe utilizarse según normas del CLSI o EUCAST. El uso bajo otras normas debe ser validado por el usuario.
- Para la interpretación de los resultados se debe tener en cuenta las características propias de la especie sometida a prueba.
- El material utilizado debe descartarse de manera segura de acuerdo a las normativas de bioseguridad vigentes en el país.



Conservación:

Conservado refrigerado entre 2º y 12º C es estable hasta la fecha de caducidad. El medio de cultivo se debe almacenar sellado y con la cubierta de la placa (tapa) hacia abajo. Se recomienda almacenar a temperaturas cercanas a 8°C. *A menor temperatura de almacenamiento mayor probabilidad de condensación y por tanto mayor riesgo de filtración del sello de PVC. Evite la congelación.*

Muestras a cultivar:

Este medio de cultivo debe utilizarse con inóculos calibrados obtenidos a partir de cepas puras de *Candida* sp. aisladas sobre Agar Sabouraud dextrosa. Para preparar el inóculo, toque cinco colonias aisladas de un cultivo de 24 horas, y suspéndalas en suero fisiológico estéril, ajuste a una turbidez equivalente al standard McFarland 0.5. Se obtiene una suspensión equivalente a 1x10⁶ a 5x10⁶ UFC/mL Para *Cryptococcus neoformans* preparar una suspensión equivalente a McFarland 1.0 a partir de un cultivo de 48 a 72 horas.

Inoculación:

Sumergir una tórula estéril de algodón en la suspensión de levaduras, escurrir el exceso y sembrar toda la superficie del agar, rotando la placa tres veces para una

distribución uniforme. Deje secar unos minutos hasta que se absorba el exceso de humedad. Aplique las tiras de antifúngico colocando primero la zona de menor concentración y presionando suavemente contra el agar. Si prueba con varias tiras, coloque dos en forma antiparalela. Conserve una distancia de unos 3 cm entre tiras para obtener elipses de inhibición no confluentes.

Incubación:

24 a 48 horas a 35° C para *Cándida sp.* y 48 a 72 horas para *Cryptococcus sp.* Incubar hasta 48 horas si no hay desarrollo suficiente a las 24 horas. *Candida glabrata* y *Candida krusei* pueden requerir 48 horas de incubación.

Lectura e interpretación de resultados:

Para los antifúngicos azoles, la CIM corresponde a la concentración más baja del antifúngico en el sitio de intersección de la elipse de inhibición con la tira. No considerar las colonias pequeñas aisladas que se presenten al interior de la elipse. Si se presenta un doble halo de inhibición por efecto de resistencia, determine la CIM midiendo el halo más interno.

Para la determinación de Anfotericina B, considere el desarrollo de toda colonia al interior del halo de inhibición, independiente de su tamaño.

Realice la determinación de la CIM a partir de las 24 horas de incubación cuando ya exista un desarrollo que lo permita. La sobre incubación puede originar resultados imprecisos.

Determine el punto de corte expresado en µg/mL, e informe la condición de la levadura en estudio como S (sensible), S-DD (sensible dosis dependiente) y R (resistente) de acuerdo a los valores de corte.

Si no observa inhibición reporte la resistencia como mayor al máximo de concentración indicado en la tira.

Control de Calidad del Usuario:

Se recomienda realizar control de calidad de acuerdo a los protocolos CLSI con cepas de control mantenidas a -70°C, las que se deben subcultivar sobre Agar Sabouraud y conservar a 8°C por 15 días. Las cepas de control recomendadas son:

Candida krusei ATCC 6258
Candida parapsilosis ATCC 22019

A modo de referencia puede utilizar la siguiente información: Las cepas de control deben mantenerse dentro del intervalo indicado, con una tolerancia de error de dos mediciones fuera de rango en una serie de 20 determinaciones consecutivas.

Intervalos de CIM (mg/L) para cepas control:

Antifúngico	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258
Anfotericina B	0.25 – 2.00	0.50 – 2.00
Fluorocitosina	0.12 – 0.50	> 0.32
Fluconazol	2.0 – 8.0	> 256
Itraconazol	0.06 – 0.25	0.12 – 0.50
Ketoconazol	0.03 – 0.12	0.25 – 1.00

Los usuarios son responsables de la frecuencia y de los alcances de sus controles de calidad.

Limitaciones de Uso:

El Agar RPMI 1640 con 2% de glucosa se ha desarrollado para las pruebas que se indican en este documento, calibradas según recomendaciones del CLSI. La inoculación inadecuada, la densidad del inóculo, el exceso de humedad y la sobre incubación afectan los resultados de las pruebas.

Cualquier otra variación de su uso es de responsabilidad del usuario.

Control de esterilidad*:

1. - No hubo desarrollo a las 48 horas de cultivo (37°C, aeróbico).
- 2.- No hubo desarrollo a las 240 horas de cultivo (20°C, aeróbico).

Control de fertilidad*:

Al cultivar en este lote las cepas de control que se indican, se esperan los siguientes resultados de desarrollo:

Cultivo a 35°C, atmósfera aeróbica:

<i>Candida albicans</i> ATCC 90028:	bueno.
<i>Candida krusei</i> ATCC 6528:	bueno.
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	bueno.
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	bueno.

* Cumple norma ISO 13485:2003 y norma NCh 3162/2.Of2008 Certificados de conformidad para el lote deben ser solicitados por el cliente.

Eliminación de Desechos:

El usuario es responsable de la adecuada eliminación de los materiales para diagnóstico microbiológico estén utilizados o no, para lo que deberá estar en conocimiento cabal de la normativa local vigente respecto de la disposición de material infeccioso o potencialmente infeccioso. Cada laboratorio asume la responsabilidad de la gestión de sus desechos y efluentes, sea por cuenta propia o mediante terceros que garanticen el adecuado tratamiento de estos, y según lo determinen las reglamentaciones locales vigentes.

Rev.1.: 11/2013 CIO