

2 Ej. No. 6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química



**ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE CONTROL
DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE
MICROBIOLOGIA CLINICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

MARIA TERESA AGUSTINA ARAGON HERNANDEZ

México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

- 1.- INTRODUCCION.
- 2.- PRECAUCIONES Y MEDIDAS DE SEGURIDAD PARA LLEVAR A CABO EL CONTROL DE CALIDAD.
- 3.- PROCEDIMIENTOS GENERALES QUE REALIZA UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA Y QUE DEBEN SUJETARSE A CONTROL DE CALIDAD.
 - 3.1. Medios de cultivo
 - 3.1.1. Preparación de medios de cultivo
 - 3.1.2. Esterilización
 - 3.1.3. Pruebas de esterilidad
 - 3.1.4. Efectividad de los medios de cultivo
 - 3.2. Reactivos
 - 3.2.1. Reactivos comerciales
 - 3.2.2. Reactivos preparados en el laboratorio
 - 3.2.3. Reactivos biológicos
 - 3.2.3.1. Sueros antiespecie, conservación y potencia.
 - 3.2.3.2. Plasma, control de efectividad
 - 3.2.3.3. Discos de papel filtro con antibióticos
 - 3.2.3.4. Discos y tiras impregnadas con reactivos
 - 3.3. Pruebas de susceptibilidad
 - 3.4. Cepario de aerobios y anaerobios
 - 3.4.1. Microorganismos aislados en el laboratorio
 - 3.4.2. La utilidad de la American Type Culture Collection (ATCC) en el control de calidad de Microbiología
 - 3.5. Tinciones
 - 3.5.1. Tiempo de reacción
 - 3.5.2. Control con microorganismos conocidos

4.- EVALUACION DEL TRABAJO DEL LABORATORIO

- 4.1. Cultivos ciegos
- 4.2. Cepas de identidad desconocida
- 4.3. Revisión diaria de resultados
- 4.4. Revisión periódica de resultados

5.- PROCEDIMIENTOS PARA LA CALIBRACION, MANTENIMIENTO Y MANEJO DE EQUIPO

Autoclave

Baños de agua

Centrifugas

Refrigeradores

Microscopios

Balanzas

Jarras de Gas-Pack

6.- PARTE EXPERIMENTAL

7.- RESULTADOS

8.- DISCUSION

9.- CONCLUSIONES

10.- BIBLIOGRAFIA

1.- I N T R O D U C C I O N

El control de calidad tuvo su origen en la industria cuando Shewart estableció sus principios básicos; años más tarde, en 1946, se empezó a aplicar en el laboratorio clínico cuando Wermiermont utilizó la media aritmética y el rango como elementos estadísticos. En 1950 Lavey y Jennings agregaron el uso de la desviación estándar y el empleo de cartas especialmente diseñadas para el registro de los datos obtenidos. El control de calidad es un programa sistemático y permanente para detectar y eliminar (o reducir al mínimo) errores que son responsabilidad del laboratorio y que afectarán finalmente la calidad de los resultados generados. (14), (18).

En años recientes algunas instituciones en los Estados Unidos de Norte América, como la Food and Drug Administration (FDA) y la Clínica Mayo en Rochester, Minnesota, E. E. U. U., empezaron a enfatizar la necesidad de instituir un programa de control de calidad en Microbiología Clínica. Una parte de este control se ha hecho obligatorio de acuerdo a las ordenanzas para laboratorios clínicos publicadas en el Registro Federal de los Estados Unidos en 1968. En ellas se hacen recomendaciones prácticas que pueden adaptarse al trabajo realizado en un laboratorio de cualquier capacidad. (2), (29). En el laboratorio clínico, en las secciones de Química Clínica y Hematología, se facili

ta el establecimiento de procedimientos estadísticos de control de calidad debido a la naturaleza cuantitativa de muchas de las pruebas - realizadas. En contraste, Microbiología Clínica es básicamente una - disciplina cualitativa que además requiere interpretación subjetiva. Las variables en la colección y transporte de muestras, selección y - uso de medios de aislamiento apropiados, condiciones de incubación, - criterios de identificación, pruebas de susceptibilidad a antimicrobiauos y el informe de resultados, pueden proporcionar posibles fuentes - de error que, finalmente, producirán información irrelevante o errónea. Por consiguiente, un programa de control de calidad debe incluir a toodos estos aspectos, de tal manera que puedan determinarse los límites de confiabilidad de los procedimientos microbiológicos a un costo razounable, para que la información que se proporciona al médico tenga releuvancia clínica. El programa de control de calidad dependerá del tamauño del laboratorio y el tipo de pruebas que en él se realicen y deberá incluir todos los procedimientos a pasos antes mencionados.

The American British Cowdray Hospital es un nosocomio con 152 camas, - que atiende enfermos con padecimientos agudos principalmente y también proporciona servicio a pacientes externos.

Su laboratorio clínico realiza aproximadamente 131,000 estudios anualumente, correspondiente el 7.7% de éstos a la sección de Microbiología Clínica.

En febrero de 1982, el laboratorio en que se realizó este trabajo, -
atravesó por una fase de reorganización, reestructuración e implemen-
tación de nuevos sistemas de trabajo, iniciándose un mes después, un
programa elemental de control de calidad en la sección de Microbiolo-
gía, el cual continúa ampliándose y mejorándose paulatinamente.

El objetivo de este trabajo de tesis fue el de revisar los principios
generales del control de calidad ya establecidos en otros países, pa-
ra adaptarlos a las circunstancias peculiares de trabajo de nuestro -
laboratorio y comunicar las experiencias que se tuvieron en la imple-
mentación del mismo, a fin de que pueda servir como guía para otros -
laboratorios interesados en el control de calidad.

2.- PRECAUCIONES Y MEDIDAS DE SEGURIDAD PARA LLEVAR A CABO EL CONTROL DE CALIDAD.

- 1.- Todos los microorganismos manejados en el laboratorio deben considerarse potencialmente patógenos.
- 2.- Debe prohibirse fumar, comer, beber, llevarse objetos a la boca así como tocarse la cara con las manos dentro del laboratorio. - Esta prohibición debe recordarse con anuncios claramente visibles fijados en las paredes.
- 3.- Todos los artículos personales como bolsas de mano, anteojos, - etc., deben guardarse fuera de las áreas de trabajo.
- 4.- Se usará bata durante el trabajo y se dejará dentro del laboratorio al salir de él. Si las batas se lavan en casa se transportarán dentro de una bolsa de plástico y se lavarán por separado.
- 5.- Al empezar y terminar las labores del día se debe limpiar el área de trabajo con fenol al 5%, seguido de hipoclorito de sodio al 0.05%, utilizando guantes de hule para esta maniobra.
- 6.- No debe permitirse que se acumule el polvo dentro del laboratorio.
- 7.- Si por accidente se derrama un cultivo debe ponerse hipoclorito de sodio al 2% sobre el área contaminada, cubrirla con toallas de papel y esperar 15 minutos, depositar después las toallas contaminadas en un recipiente y esterilizarlas en autoclave.
- 8.- Las uñas y manos deben lavarse con un cepillo blando y una solución antiséptica tan frecuentemente como se requiera, especialmente después de contaminación accidental y también al abandonar

3.- PROCEDIMIENTOS GENERALES QUE DEBE REALIZAR UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA Y QUE DEBEN SUJETARSE A CONTROL DE CALIDAD.

3.1 Medios de cultivo.

3.1.1 Preparación de medios de cultivo

Los fabricantes de medios cultivo teóricamente tienen un control de calidad interno para los medios base que producen; sin embargo, esto no exime al laboratorio clínico o a cualquier otro laboratorio, de llevar su propio control de calidad para los medios que se preparen. (23), (30).

Aparentemente la preparación de un medio de cultivo es simple, pero puede estar sujeta a varios factores de error como serían algunos de los siguientes:

1.- Almacenar inadecuadamente los medios. Todos los medios base deben ser almacenados de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes para evitar deterioro por exposición al calor, humedad, oxidación u otras condiciones ambientales desfavorables.

Cuando estén ya preparados, es importante evitar su deshidratación, misma que se manifiesta por agrietamiento o enjutamiento de los mismos, ocasionando concentración de los ingredientes y disminución de su capacidad para apoyar el desarrollo bacteriano. La deshidratación puede evitarse o retrasarse colocando las placas en bolsas de plástico y almacenándolas en el refrigerador.

(2), (6), (12), (13), (21), (25), (27), (30).

Para fechas de expiración de los diferentes medios consultar -
las tablas 1 y 2. (12)

Antes de usar las placas, deben estar a temperatura ambiente -
de una a dos horas aproximadamente.

- 2.- Utilizar cantidades incorrectas de los medios, por error al pe-
sarlás o por funcionamiento defectuoso de las balanzas.
- 3.- Usar agua corriente, en su lugar se utilizará agua destilada -
con mínima contaminación bacteriológica.
- 4.- Utilizar un volumen diferente de agua al indicado por el fabri-
cante.
- 5.- Usar cristalería sucia u otro tipo de materiales que puedan con-
tener residuos de detergentes, contaminantes químicos o simple-
mente polvo.
- 6.- Mezclar insuficientemente los ingredientes del medio, lo cual -
puede producir coágulos y en consecuencia la consistencia final
puede ser demasiado dura, o blanda, o bien propiciar una distri-
bución irregular de los ingredientes en las cajas de cultivo o -
en los tubos.
- 7.- Sobrecalentar los medios por reesterilización, conservarlos por

períodos prolongados en baño María una vez fundidos, o no respetar el proceso de esterilización en cuanto a tiempos y temperaturas, todo puede causar precipitación, hidrólisis y ablandamiento del agar, caramelización de los carbohidratos, alteración del pH, aumento de la acción inhibitoria o pérdida del colorante, que producen finalmente una reducción de la capacidad para promover el desarrollo.

- 8.- Enfriar bruscamente los medios después de esterilizarlos y vaciarlos a las cajas o tubos, ya que ocasiona precipitación o coagulación de los mismos.
- 9.- Determinar incorrectamente el pH, ya que si no es el correcto, se modifican las características del medio. Este debe rectificarse - electromecánicamente a temperatura ambiente en el momento de preparar los medios agregando ácidos o álcalis, según lo requiera, - hasta obtener el pH requerido y también después del proceso de esterilización introduciendo el electrodo directamente en los tubos o en el espesor del agar. El pH deseado debe tener una tolerancia de ± 0.2 . Si un medio de cultivo va a permanecer almacenado durante varios días, se deberá determinar su pH antes de utilizarlo a fin de asegurarse de que no ha variado durante este tiempo.
- 10.- No identificar los medios con su nombre o abreviatura, ni registrar en la caja su fecha de preparación.

11.- No examinar los medios de cultivo adquiridos ya preparados para corroborar sus características físicas. Si el color de un nuevo lote de medios difiere de lotes previos, el pH debe ser verificado.

12.- Exponer al efecto de la luz medios que contengan colorantes fotosensibles, éstos deben protegerse con papel opaco.

13.- Adicionar ingredientes no estériles a los medios ya esterilizados. A menudo se les agregan nutrientes deshidratados, sustancias de enriquecimiento u otros aditivos. El enriquecimiento más frecuentemente usado, es la sangre de diferentes especies; la sangre humana nunca debe emplearse, ya que los anticuerpos, complemento y otros componentes antibacterianos del sistema inmune, así como la presencia de fármacos, pueden tener efecto bacteriostático o bactericida.

La sangre de carnero desfibrinada es probablemente la más eficiente para el trabajo rutinario porque:

- a) Las reacciones hemolíticas del estreptococo son más evidentes.
- b) Se inhibe el crecimiento de Haemophilus haemolyticus, bacteria no patógena, lo cual es ventajoso ya que las calorías de este microorganismo, pueden confundirse con las de estreptococo hemolítico.
- c) Es menos costosa que la sangre de otras especies.

3.1.2 Esterilización.

La esterilización es un procedimiento físico y/o químico utilizado para disminuir el número de microorganismos presentes en algún material o sustancia.

Desde el punto de vista médico-farmacéutico, la esterilización se entiende como la ausencia comprobable, en condiciones habituales de cultivo, de microorganismos vivos con capacidad de reproducción, independientemente de su forma de vida (células vegetativas, formas L y esporas). En el sentido biológico, el término es más estricto y la ausencia de crecimiento incluye, además de las formas bacterianas arriba mencionadas, a los hongos, parásitos mononucleares y virus. (9), (17).

Para la esterilización en microbiología, ya sea de medios de cultivo o cualquier otro material de laboratorio, tiene que elegirse el agente esterilizante adecuado y comprobarse su eficacia. En términos generales, el calor es el medio físico más utilizado, pudiendo emplearse tanto el seco como húmedo. Este último es más eficaz y se realiza siempre con vapor a presión en autoclave o en una olla con cierre hermético. Para la mayoría de los materiales, el procedimiento estándar para un autoclave requiere de una presión de 1.05 Kg/cm^2 , - 15 lbs y una temperatura de 121°C durante 15 minutos.

El procedimiento y funcionamiento del equipo se controla mediante -

la verificación constante de las presiones alcanzadas en el manómetro, así como el exacto cumplimiento del tiempo establecido, ambos controles deben quedar registrados en una hoja diseñada para este fin. Estos parámetros sólo permiten una conclusión indirecta de la calidad de la esterilización. La comprobación directa se realiza mediante el uso de bioindicadores cuya aplicación y ventajas describió desde 1897 Robert Koch (15). Los bioindicadores permiten hacer un análisis cinético del proceso de destrucción de microorganismos de una sola especie con resistencia conocida frente al agente esterilizante.

Los bioindicadores pueden clasificarse de acuerdo con el agente esterilizante (por ejemplo calor seco, vapor de agua, radiaciones ionizantes, gases o líquidos) o según el material de soporte.

Para cada agente esterilizante se debe escoger el bioindicador correspondiente que ofrezca la resistencia óptima al mismo. La elección depende de las características del proceso de esterilización y del material a esterilizar.

Los requisitos para el uso de bioindicadores son los siguientes:

- a) Las bacterias de las que proceden las esporas no deben ser patógenas.
- b) No deben formar toxinas ni pirógenos.

- c) No deben ser capaces de replicarse a 37° C o a temperaturas más bajas.
- d) Se debe contar con el dato del número de lote y fecha de fabricación.
- e) Fecha de caducidad.
- f) Instrucciones de empleo y almacenamiento.
- g) Instrucciones para su destrucción. (9), (15), (17).

El bioindicador más utilizado en autoclave son las esporas de Bacillus stearothermophilus, que posee resistencia ya establecida en caldo nutritivo e incluye en el envase, hidratos de carbono de reacción ácida al ser fermentados y un indicador ácido-base (púrpura de bromocresol) que determina el cambio de pH del medio.

Después de la esterilización en autoclave, las ampollitas se incuban a 56° C, las esporas que hayan sobrevivido se multiplicarán formando ácidos por el metabolismo de los carbohidratos, que provocan cambio del indicador de violeta a amarillo, mostrando una esterilización incompleta. Idealmente, con cada carga de material a esterilizar se deben colocar varios indicadores en posiciones diferentes del autoclave; con sólo un bioindicador que manifieste que la esterilización fué incompleta, se debe revisar todo el procedimiento de esterilización. Si no es económicamente posible hacer este control estricto,

es suficiente utilizar un bioindicador en una carga, solamente en un día previamente establecido a la semana y hacer control de todas las demás cargas con cintas testigo.

3.1.3 Pruebas de esterilidad.

Una vez que los medios se han preparado en el laboratorio, es necesario probar su esterilidad como condición previa para autorizar su utilización. Este requisito está evaluando, en última instancia, a todo el proceso de elaboración. (6), (12), (13), (21), (25), (26), (27), (30).

Las pruebas de esterilidad puede llevarse a cabo en todos los medios - contenidos en cajas o tubos incluyendo a los que se les adicionan componentes estériles; por ejemplo carbohidratos u otros enriquecimientos lábiles.

La esterilidad debe probarse con una muestra estadísticamente significativa del total de unidades preparadas en cada lote. No es costeable y a la vez se corre el riesgo de contaminación o deterioro, si se evalúa a todo el lote.

Cuando se trata de medios enriquecidos (gelosa sangre, chocolate, etc.) es suficiente analizar el 5% del total de cada lote de cajas o tubos y, para medios selectivos o diferenciales, basta el 1 ó 2% del total. -

Las muestras seleccionadas deben incubarse a la temperatura a la cual va a ser usado el medio y el resto de ellas se mantienen a temperatura ambiente, ambas durante un período de 24 horas. En esta forma se estimula el crecimiento de microorganismos contaminantes en caso de que estén presentes. Si no hay desarrollo, los medios pueden utilizarse.

En ocasiones pueden observarse colonias contaminantes después del período de esterilidad de 24 horas, haciéndose evidentes hasta después del período de incubación, cuando las cajas o tubos se han inoculado ya con una muestra clínica. Estos contaminantes deben identificarse, ya que así puede localizarse la fuente de que provienen. Si las colonias crecen en el espesor de la caja puede pensarse que los medios se contaminaron en alguna etapa del proceso de elaboración y si desarrolla solamente en la superficie, ésta pudo haberse adquirido por contaminantes del ambiente o inocularse junto con la muestra clínica. La persona que trabaje con estos medios debe estar atenta para detectar estas colonias contaminantes y no confundirlas con las provenientes de la muestra.

La contaminación en los medios que no requieren esterilización, puede no ser notada con los métodos ya descritos porque son inhibitorios para muchos microorganismos, así que es conveniente hacer una dilución 1:10 en caldo estéril del medio base, e incubarlo durante 24 horas. -

En esta forma se diluyen las sustancias inhibitorias y se logra un -
aislamiento más rápido y puro de los contaminantes.

FECHAS DE EXPIRACION PARA MEDIOS EN PLACAS, CALCULADOS A PARTIR DE LA FECHA DE PREPARACION.

MEDIOS	FECHA DE EXPIRACION
Agar bilis esculina	6 semanas
Agar infusión cerebro corazón	6 semanas
Agar infusión cerebro corazón con sangre	6 semanas
Agar chocolate	1 mes
Agar sangre Columbia	1 mes
Agar DNAasa con azul de toluidina	6 semanas
Agar EMB	1 mes
Agar Hektoen - enteric	1 mes
Agar Mac Conkey	1 mes
Agar fenil etil alcohol con sangre	1 mes
Agar dextrosa Sabouraud	6 semanas
Agar Thayer - Martin	1 mes
Agar tripticasa soya	6 semanas
Agar XLD	1 mes

TABLA 3.1.1.a

FECHAS DE EXPIRACION PARA MEDIOS EN TUBO CALCULADOS A PARTIR DE LA
FECHA DE PREPARACION.

MEDIOS	FECHAS DE EXPIRACION
Agar base Bordet-Gengou	6 semanas
Caldo infusión cerebro corazón	6 meses
Agar infusión cerebro corazón	6 meses
Agar cisteína tripticasa	6 meses
Agar cisteína tripticasa con carbohidratos	6 semanas
Sustrato de hipurato (congelado a -20° C)	3 meses
Caldo nitrato-indol	1 mes
Caldo indol-nitrato-movilidad	1 mes
Caldo base de KCN	6 meses
Agar lisina hierro	6 meses
Caldo malonato	6 meses
Caldo de MR-VP	6 meses
Agar nitrato	6 meses
Agar triple azúcar hierro	6 meses
Tioglicolato	1 mes
Agar citrato de Simmons	3 meses
Caldo Todd-Hewitt	6 meses
Caldo selenita	6 meses
Agar dextrosa Sabouraud	6 meses
Agar urea	6 meses
Caldo tripticasa soya con NaCl al 6.5%	6 meses
Caldo nutritivo	6 meses

TABLA 3.1.1. b

3.1.4 Efectividad de los medios de cultivo.

Una vez que los medios han pasado las pruebas de esterilidad, debe evaluarse su capacidad para estimular o inhibir el desarrollo de microorganismos de referencia, de los que se conocen sus características morfológicas y bioquímicas al desarrollar en un determinado medio, esperándose buena reproducibilidad entre los medios recientemente preparados así como en los que se han preparado anteriormente. (2), (6), (12), (27).

De las colonias formadas se observarán sus características morfológicas (tamaño, aspecto, forma, etc.), así como sus reacciones al medio (pigmento, hemólisis, etc.).

Algunos medios, sobre todo los que se utilizan para el desarrollo de microorganismos de crecimiento difícil, deben probarse con especial interés, ya que a estos generalmente se les adicionan componentes para enriquecerlos o hacerlos inhibitorios para algunos microorganismos y durante la esterilización o preparación pueden haber perdido o disminuido su efectividad.

Los medios selectivos o diferenciales deben evaluarse tanto con microorganismos que puedan desarrollar en ellos, como frente a los que son inhibidos por éste.

Los medios para pruebas bioquímicas deben verificarse con dos o más microorganismos que den resultados positivos y negativos.

El inóculo utilizado para las pruebas de medios sólidos en cajas no debe ser abundante. Un inóculo satisfactorio y relativamente estandarizado, se consigue preparando una dilución 1:10 de una suspensión del cultivo de prueba en un caldo estéril, equivalente a una turbiedad de 0.5 en el estándar de Mc Farland, utilizando una asa calibrada de 0.001 ml de capacidad.

En los medios para pruebas bioquímicas la técnica de inoculación dependerá del medio que se evalúe.

En la siguiente tabla (3.1.4.) se indican los medios más utilizados en el laboratorio, los microorganismos recomendados para su control de calidad y los resultados que se deben esperar. Esta es una guía general y cada laboratorio debe seleccionar lo que le interese según sea la variedad de medios que utilice para satisfacer sus necesidades de aislamiento e identificación.

MICROORGANISMOS RECOMENDADOS PARA CONTROL DE EFECTIVIDAD DE MEDIOS EN PLACA Y EN TUBO

MEDIOS	CONTROL POSITIVO	RESULTADO ESPERADO	CONTROL NEGATIVO	RESULTADO ESPERADO	FRECUENCIA DE LA PRUEBA
BILIS ESCULINA	Enterococos	Crece, el medio cambia a negro	<u>Streptococcus</u> Grupo "A"	No hay desarrollo ni cambio de color en el medio	Cada lote
AGAR CHOCOLATE	<u>Haemophilus influenzae</u>	Crecimiento incrementado	Ninguno		Cada lote
AGAR SANGRE COLUMBIA	<u>Escherichia coli</u>	Crecimiento de colonias típicas	Ninguno		Cada lote
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Crecimiento de colonias típicas	Ninguno		Cada lote
	<u>Streptococcus</u> Grupo "A"	Crecimiento de colonias típicas, y beta-hemólisis	Ninguno		Cada lote
	<u>Streptococcus pneumoniae</u>	Crecimiento de colonias típicas, y alfa-hemólisis	Ninguno		Cada lote
	Enterococos	Crecimiento de colonias típicas.	Ninguno		Cada lote

TABLA 3.1.4.

MICROORGANISMOS RECOMENDADOS PARA EL CONTROL DE EFECTIVIDAD DE MEDIOS EN PLACA Y EN TUBO

MEDIOS	CONTROL POSITIVO	RESULTADO ESPERADO	CONTROL NEGATIVO	RESULTADO ESPERADO	FRECUENCIA DE LA PRUEBA
AGAR CITRATO	<u>Enterobacter cloacae</u>	Crece en el agar cambiando a azul prusia.	<u>Escherichia coli</u>	No crece	Cada lote
AGAR CISTINA TRIPTICASA	<u>Escherichia coli</u> y disco de dextrosa.	Crecimiento con producción de ácido (amarillo)	<u>Escherichia coli</u> sin disco de dextrosa.	Crece, sin producción de ácido.	Cada lote
CALDO HIPLURATO	<u>Streptococcus</u> Grupo "B" (cepas hemolíticas y no hemolíticas).	El medio vira a púrpura al adicionar ninhidrina.	<u>Streptococcus</u> Grupo "D"	El medio no cambia a púrpura al adicionar ninhidrina	Cada lote
MEDIO INDOL-NITRATO-MOTILIDAD	<u>Bacteroides fragilis ssp. thetaiotaomicron.</u>	Producción de indol	<u>Bacteroides fragilis ssp. fragilis</u>	No produce indol	Cada lote
	<u>Clostridium novyi</u> tipo "A"	Movilidad positiva	<u>Bacteroides fragilis</u>	Movilidad positiva	Cada lote
LISINA HIERRO	<u>Edwardsiella tarda.</u>	Alcalino/Alcalino H ₂ S (+)	<u>Proteus mirabilis</u>	Rojó/Alcalino H ₂ S (-)	Cada lote

MICROORGANISMOS RECOMENDADOS PARA EL CONTROL DE EFECTIVIDAD DE MEDIOS EN PLACA Y TUBO

MEDIOS	CONTROL POSITIVO	RESULTADO ESPERADO	CONTROL NEGATIVO	RESULTADO ESPERADO	FRECUENCIA DE LA PRUEBA
HIERRO AGAR	<u>Proteus vulgaris</u>	Alcalino/ácido con H ₂ S	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Alcalino/neutro sin H ₂ S	Cada lote
TRIPTICASA CALDO SANGRE	<u>Clostridium novyi</u> grupo "A"	Crece	Ninguno		Cada lote
	<u>Bacteroides fragilis</u>	Crece			
	<u>Haemophilus influenzae</u>	Crece			
AGAR UREA INCLINADO	<u>Proteus vulgaris</u>	Cambia el medio a rosa	<u>Escherichia coli</u>	No cambia el color del medio	Cada lote
CALDO DE VOGES-PROSKAUER	<u>Enterobacter aerogenes</u>	Cambia el color del medio con adición - de reactivo de alfa naftol	<u>Escherichia coli</u>	No cambia el color del medio	Cada lote
AGAR NITRATO	<u>Escherichia coli</u>	Cambia el color del medio a rojo cuando se adiciona el reactivo	<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	No cambia el color del medio cuando se adiciona el reactivo	Cada lote

MICROORGANISMOS RECOMENDADOS PARA EL CONTROL DE EFECTIVIDAD DE MEDIOS EN PLACA Y TUBO

MEDIOS	CONTROL POSITIVO	RESULTADO ESPERADO	CONTROL NEGATIVO	RESULTADO ESPERADO	FRECUENCIA DE LA PRUEBA
LOWENSTEIN JENSEN	<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	Crecimiento caracte rístico	Ninguno		Cada lote
CÁLDO MALONATO	<u>Enterobacter aerogenes</u>	Cambia el color del medio a azul prusia	<u>Escherichia coli</u>	No cambia el color del medio	Cada lote
CALDO ROJO DE METILO	<u>Escherichia coli</u>	Cambia el color del medio de amarillo a rojo con adición -- del reactivo	<u>Enterobacter aerogenes</u>	No hay cambio de color	Cada lote
AGAR FENIL-ETILICO	<u>Staphylococcus</u>	Crecimiento incremen tado	<u>Proteus mirabilis</u> <u>Pseudomonas aeru- ginosa</u>	Inhibición del creci miento	Cada lote
CALDO SOYA TRIPTI- CASA CON NaCl al 6.5%	<u>Enterococos</u>	Crecimiento, turbi- dez del medio	<u>Streptococcus</u> grupo "B"	No hay crecimiento	Cada lote

3.2. Reactivos.

3.2.1 Reactivos comerciales.

Una diversidad de reactivos usados en microbiología se adquieren comercialmente. Para su control, es importante registrar de ellos la siguiente información: (21), (28).

- 1.- Procedencia: Datos de identificación del fabricante (nombre, domicilio, teléfono) para cualquier aclaración sobre su producto.
- 2.- Marca: Dato importante porque la calidad del producto puede variar de un fabricante a otro, por consiguiente, todo reactivo con una nueva marca debe ser evaluado, comparando sus reacciones con las del producto anterior.
- 3.- Número y características del lote: Debe aclararse cualquier diferencia entre el rendimiento del reactivo y las características proporcionadas por el fabricante.
- 4.- Fecha de recepción en el laboratorio y cuándo fue puesto en uso: En algunos reactivos, su vigencia comienza desde el momento en que el frasco se abre, la fecha de caducidad debe ser proporcionada por el fabricante. Se deben realizar pruebas de efectividad

periódicamente, aún dentro del período de vigencia, o cuando vaya a ser usado si es que transcurrió mucho tiempo sin utilizarse.

Se deben descartar todos los productos caducos.

Los reactivos químicos deben almacenarse de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes y del tipo de composición de cada uno de ellos.

Como regla general, nunca deben utilizarse reactivos que no hayan sido probados con controles positivos y negativos.

3.2.2 Reactivos preparados en el laboratorio.

La variedad de reactivos que se preparen en el laboratorio, dependerá de los métodos que ahí se realicen. Algunos de los reactivos no serán viables por mucho tiempo, por lo que debe tomarse en consideración lo siguiente: (2), (12), (21).

Algunos reactivos tienen que almacenarse en el refrigerador o a temperatura ambiente, igualmente pueden requerir envases de color ámbar para protegerlos contra la luz.

Para algunos reactivos no existe fecha de caducidad; sin embargo, de acuerdo a la composición química y estabilidad del reactivo, se le dará una fecha límite no mayor de seis meses del día en que se preparó y dentro de la cual se probará su eficiencia. Para los reactivos en los que sí hay una fecha de caducidad, su uso se ajustará al tiempo marcado.

No se deben utilizar reactivos que no tengan marcadas en el exterior del envase la fecha de caducidad y la de su preparación.

La eficiencia de todos los reactivos preparados en el laboratorio se debe probar antes de utilizarlos en el trabajo diario.

Cada nuevo lote debe verificarse según lo requiera el reactivo, regis-

trándose los resultados con el nombre de los microorganismos con los - que se realizó el control positivo o negativo y las observaciones - que llevaron a su aceptación o rechazo; a continuación se darán datos de reactivos comúnmente usados en el laboratorio.

3.2.3. Reactivos biológicos.

Todos los reactivos que tienen un principio biológico deben tratarse con especial cuidado, ya que pequeñas variaciones en sus propiedades pueden alterar los resultados de las pruebas para los que fueron destinados. A continuación se comentarán algunos de los reactivos biológicos más utilizados en el laboratorio.

3.2.3.1 Sueros antiespecie, conservación, potencia.

Conservación: Los sueros se deben almacenar en el refrigerador a la - temperatura estipulada por el fabricante, cuando se utilicen debe haber una mínima exposición a la temperatura ambiente, su transparencia y color no deben experimentar algún cambio pues esto puede indicar deterioro y por lo tanto no deben usarse. (2), (6), (21).

Caducidad: Todos los sueros para tipificar microorganismos deben tener la fecha de recepción en el laboratorio y la de su reconstitución. No se deben almacenar más sueros de los que esté previsto que se utiliza-

rán en un tiempo determinado de trabajo, ya que por su naturaleza biológica, pierden su potencia.

Potencia: Los sueros deberán mostrar su capacidad de aglutinación ante microorganismos que sean positivos o no mostrarla en los casos negativos, cada frasco vial deberá comprobarse antes de usarse por primera vez y a intervalos durante todo su uso. No deben utilizarse después de la fecha de expiración.

Cada vez que se prueben los sueros se utilizará un control positivo y un negativo, éste último no deberá ser sólo solución salina sino un microorganismo para el cual la reacción es negativa.

3.2.3.2 Plasma, control de efectividad.

Los plasmas recomendados para realizar la prueba de coagulasa son el humano y de preferencia el de conejo, aunque otras alternativas pueden ser el de caballo, carnero o bovino. Estos deben ser estériles, ya sea en fresco o liofilizados (deshidratados). (29), (21).

Del plasma comercial, se debe reconstituir solamente la cantidad necesaria para el uso diario. No se recomienda guardar frascos de plasma rehidratado a menos que se congele. El plasma se rehidrata utilizando una pipeta estéril y con agua destilada, de acuerdo a las indicaciones del marbete.

El plasma fresco, a partir de sangre entera, se obtiene centrifugándola y obteniéndolo asépticamente en un recipiente estéril, evitando recoger hematies.

Antes de emplear plasma citratado, se recomienda agregar heparina para eliminar una reacción de coagulasa retardada, positiva falsa, debida a microorganismos capaces de utilizar citrato, originando de tal modo - que el plasma coagule.

El control de efectividad se realiza haciendo reaccionar el plasma con cultivos positivos y negativos conocidos, antes de su empleo general, las cepas utilizadas son, Staphylococcus aureus (coagulasa positiva) y Staphylococcus epidermidis (coagulasa negativa). Asimismo puede controlarse su coagulabilidad por su recalcificación, para ello se agrega una gota de cloruro de calcio al 5% a una alícuota de 0.5 ml de plasma (dilución 1:2) con lo que se formará un coágulo.

Si el plasma comercial no reacciona convenientemente con el control de efectividad, todo el lote deberá ser devuelto al fabricante.

El plasma que se utiliza en la prueba de la coagulasa debe adaptarse a los siguientes criterios: 1o. debe contener cantidades suficientes de factor reactivo de coagulasa (FRC) y fibrinógeno, 2o. debe estar exento de actividad fibrinolítica y 3o. debe estar libre de inhibidores.

El factor plasmático varía entre las especies animales, provocando diferencias en la conducta de la coagulación, la mayoría de las coagulasas coagulan el plasma humano, de cerdo, conejo y caballo, pero no el de cobayo, rata y pollo.

La concentración de FRC es máxima en el plasma humano, disminuyendo en el de cerdo, conejo y caballo.

3.2.3.3 Discos de papel filtro con antibióticos.

La conservación de los discos para pruebas de susceptibilidad generalmente se hace en el refrigerador o congelador y dentro de un desecador.

La cantidad total de discos de que dispone el laboratorio pueden ser divididos en dos partes; los que se utilizarán en los días próximos de trabajo y los que se tienen de reserva. Los primeros pueden conservarse en el refrigerador y antes de utilizarse deben estar a temperatura ambiente; los de reserva deben estar en el congelador a -14°C , principalmente los pertenecientes a las penicilinas y cefalosporinas. Estos pueden pasarse al refrigerador o utilizarse directamente, igualando antes su temperatura con la del ambiente para prevenir condensación de la humedad en la superficie de los discos (2), (6), (12), (13), (21), (26), (27), (32).

La caducidad de los discos debe vigilarse cuidadosamente; por lo general viene indicada la fecha en los envases. No se deben utilizar discos caducos. Desde 1961, la Federal Drug Administration (FDA) ha certificado el contenido y calidad de todos los discos fabricados en Estados Unidos de Norteamérica, recomienda que los discos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se sometan a control de calidad diariamente, al mismo tiempo que se realizan los antibiogramas del día, ya que aunque no estén caducos pueden perder su potencia por almacenamiento inadecuado o no cumplir con el contenido de antibiótico marcado por el fabricante; para esto se incluyen cepas de referencia junto con las cepas a investigar, las cepas de referencia con Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.

3.2.3.4 Discos y tiras impregnadas con reactivos.

Además de los discos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, - existen en la actualidad discos o tiras impregnadas con reactivos (pruebas de identificación presuntiva o bioquímicas rápidas) éstos deben almacenarse con un desecante generalmente proporcionado dentro del paquete original y bajo las condiciones sugeridas por el fabricante, quien proporciona también su fecha de caducidad. El laboratorio debe registrar la fecha en que fue puesta en uso la tira o disco de reactivos.

Todo nuevo lote de estos reactivos debe probarse antes de su uso, con microorganismos de referencia con reacción positiva y negativa. (6), (27).

MICROORGANISMOS RECOMENDADOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS, TIRAS Y DISCOS

REACTIVOS	CONTROL POSITIVO	RESULTADOS ESPERADOS	CONTROL POSITIVO	RESULTADO ESPERADO	FRECUENCIA DE LA PRUEBA
TINCION DE GRAM	<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	Microorganismos Gram positivos	<u>Escherichia coli</u> ATCC 25923	Microorganismos Gram negativos	Diario
PEROXIDO DE HIDROGENO	<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 25923	Se producen burbujas	<u>Streptococcus "A"</u>	No hay producción de burbujas	Diario
CALDO KCN	<u>Proteus vulgaris</u>	Crece	<u>Shigella sonnei</u>	No crece	Cada prueba
ROJO DE METILO	<u>Escherichia coli</u>	El caldo cambia a rojo	<u>Enterobacter aerogenes</u>	No da el color rojo	Cada lote, semanal
DISCOS DE OPTO-QUINA	<u>Streptococcus pneumoniae</u>	Zona de inhibición alrededor del disco de 15 mm	<u>Streptococcus alfa hemolítico</u>	No hay zona de inhibición alrededor del disco	Cada lote, semanal
ORNITINA DESCARBOXILASA	<u>Hafnia alvei</u>	Crece cambiando el medio a púrpura	<u>Proteus vulgaris</u>	Cambia el medio a amarillo	Cada lote, semanal

MICROORGANISMOS RECOMENDADOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS, TIRAS Y DISCOS

REACTIVOS	CONTROL POSITIVO	RESULTADOS ESPERADOS	CONTROL NEGATIVO	RESULTADOS ESPERADOS	FRECUENCIA DE LA PRUEBA
TIRAS EN PLACAS DE AGAR TRIPTI-CASA SOYA CON FACTORES	<u>Haemophilus ephrophilus</u> Factor X	Crece alrededor de la tira	<u>Haemophilus influenzae</u>	No crece alrededor de la tira	Cada lote, semanal
FACTOR V	<u>Haemophilus parainfluenzae</u>	Crece alrededor de la tira	<u>Haemophilus influenzae</u>	No crece alrededor de la tira	
FACTOR X y V	<u>Haemophilus influenzae</u>	Crece alrededor de la tira	Ninguno		
	<u>Haemophilus parainfluenzae</u>	Crece alrededor de la tira			
TIRAS DE GELATINA	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Microorganismo que licua la gelatina, dando un color azul claro.	<u>Pasteurella multocida</u>	Microorganismo que no licua la gelatina	Cada lote, cuando se realiza la prueba
GERMINACION EN TUBO	<u>Candida albicans</u>	Germinación dentro de las dos primeras horas	<u>Candida tropicalis</u>	No hay germinación dentro de las dos primeras horas	Cada que se realice la prueba.

MICROORGANISMOS RECOMENDADOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS, TIRAS Y DISCOS

REACTIVOS	CONTROL POSITIVO	RESULTADOS ESPERADOS	CONTROL NEGATIVO	RESULTADOS ESPERADOS	FRECUENCIA DE LA PRUEBA
DISCOS DE BACI- TRACINA	<u>Streptococcus</u> grupo "A"	Zona de inhibición de 10-18 mm alrede- dor del disco	<u>Streptococcus</u> grupo "B"	No hay zona de inhi- bición	Cada nuevo lote y semanalmente
DISCOS DE CARBO- HIDRATOS	Controles apro- piados	Producción de ácido	Controles apropia- dos	No hay producción de ácido	Cada lote
PLASMA PARA COA- GULASA	<u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>	Plasma coagulado	<u>Staphylococcus</u> <u>epidermidis</u>	No coagula el plasma	Diario
TIRAS PARA CITO- CROMO OXIDASA	<u>Pseudomonas ae-</u> <u>ruginosa</u> ATCC 27853	La bacteria torna la tira de azul a negra	<u>Escherichia coli</u> ATCC 25922	No produce cambio de color en la tira	Cada lote, diario
REACTIVO DE EHRlich	<u>Escherichia coli</u>	Desarrolla color ro- sado	<u>Enterobacter aero-</u> <u>genes</u>	No desarrolla color	Cada lote, semanal
CLORURO FERRICO	<u>Proteus mirabilis</u>	La parte inclinada - del agar fenil alani- na desaminasa lo tor- na verde	<u>Escherichia coli</u>	No produce ningún cam- bio en el medio fenil alanina desaminasa	Cada lote, semanal

MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE SUEROS ANTIESPECIE

SUERO TIPIFICANTE	MICROORGANISMOS CONOCIDOS	REACCION ESPERADA
<u>Arizona</u>	<u>Arizona hinshawii</u>	Aglutinación
<u>Alkalescens-dispar</u>	<u>Alkalescens dispar</u>	Aglutinación
<u>Arizona-mono</u>	<u>Arizona hinshawii</u>	Aglutinación
<u>Betheda-Ballerup</u>	<u>Citrobacter freundii</u>	Aglutinación
<u>Escherichia coli</u>	<u>Escherichia coli</u>	Aglutinación
Poli A	O26:B ₆	Aglutinación
Poli B	O86:B ₇	Aglutinación
Poli C	O18:B ₂₁	Aglutinación
<u>Haemophilus influenzae</u>	<u>Haemophilus influenzae</u>	Aglutinación
<u>Acinetobacter calcoaceticus</u> <u>var. lwoffii</u>	<u>Acinetobacter calcoaceticus</u>	Aglutinación
<u>Salmonella</u> Polivalente	<u>Salmonella sp.</u>	Aglutinación
Polivalente H	<u>Salmonella paratyphi</u>	Aglutinación
<u>Salmonella</u> Grupo A	<u>Salmonella paratyphi A</u>	Aglutinación
Grupo B	<u>Salmonella typhimurium</u>	Aglutinación
Grupo C 1	<u>Salmonella thompson</u>	Aglutinación
Grupo C 2	<u>Salmonella virginia</u>	Aglutinación

MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE SUEROS ANTIESPECIE

SUERO TIPIFICANTE	MICROORGANISMOS CONOCIDOS	REACCION ESPERADA
Grupo D	<u>Salmonella enteritidis</u>	Aglutinación
Grupo E	<u>Salmonella newington</u>	Aglutinación
Grupo VI	<u>Salmonella typhi</u>	Aglutinación
<u>Shigella</u>		
A	<u>Shigella dysenteriae</u>	Aglutinación
B	<u>Shigella flexneri</u>	Aglutinación
C	<u>Shigella boydii</u>	Aglutinación
D	<u>Shigella sonnei</u>	Aglutinación
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	<u>Streptococcus pneumoniae</u>	Aglutinación

3.3 Pruebas de susceptibilidad.

Los primeros ensayos para cuantificar la potencia antibacteriana de una sustancia, los realizó Fleming en 1924, al evaluar el efecto de diferentes antisépticos y en 1929 estableció el principio de la prueba de susceptibilidad por difusión en agar al depositar el agente antibacteriano en un orificio cilíndrico hecho en el agar, midiendo su potencia según el diámetro del halo de inhibición del crecimiento del microorganismo. (22)

Comenzaron después a utilizarse diferentes métodos, pero los resultados obtenidos no eran comparables entre los diferentes laboratorios y, muchas veces, ni aún dentro del mismo laboratorio.

En 1966, Kirby, Bauer Sherris y Thurk, (5) publicaron los criterios unificadores de la prueba por difusión en agar o antibiograma y posteriormente se han establecido diversas técnicas que han dado mayor precisión y reproducibilidad.

Las técnicas para efectuar pruebas de susceptibilidad son de tres tipos: (1)

- 1) Dilución en agar o en medio líquido.
- 2) Difusión en agar o antibiograma.
- 3) Automatizadas.

- 1) Dilución en agar o en medio líquido: En las técnicas de dilución, el antibiótico se diluye progresivamente en un medio de cultivo - líquido (caldo) o sólido (agar). Cuando se emplea un medio líquido, el antibiótico se coloca en el primer tubo y se diluye en forma seriada, al final se tendrá una cantidad progresivamente menor del antibiótico con un rango de concentraciones que simularán a - aquéllas que se alcanzarían en suero, tejidos o líquidos orgánicos, con dosis convencionales de la droga.

Después de sembrar cada tubo con el mismo inóculo (entre 10^5 y 10^6 bacterias/ml), se incuban durante 18 a 24 horas a 35°C y se busca la concentración más baja que inhibió el crecimiento.

En la técnica de dilución en agar, el microorganismo se siembra en forma de gotas con 3 a 6×10^5 bacterias en cada una de ellas sobre la superficie del medio sólido, el cual contiene una concentración determinada del antibiótico que se prueba.

Después del período de incubación habitual se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) con criterio similar al utilizado en tubo.

- 2) Difusión en agar o antibiograma: La técnica de difusión en agar, también conocida como difusión en disco, antibiograma o de Kirby-Bauer es la más utilizada en los laboratorio de Microbiología Clí-

rica. Esta técnica es, en esencia, el resultado de la interacción de tres elementos: el antibiótico depositado en el reservorio, generalmente un disco de papel filtro, un microorganismo que será inhibido o no por el antibiótico y un medio sólido (agar) que servirá de apoyo al crecimiento de la bacteria y difusión del antibiótico. Es importante seguir la técnica tal y como fué descrita por Kirby-Bauer, a continuación se describirá brevemente así como los factores que son necesarios tomar en cuenta.

Se prepara un inóculo a partir de tres a cuatro colonias perfectamente aisladas suspendiéndolas en 4 ml de caldo soya tripticasa. Se incuban los tubos a 37°C durante 2 a 5 horas hasta obtener una turbiedad equivalente al estándar de Mac Farland de 0.5. Con un hisopo se inocula la superficie del agar de Mueller Hinton estriando en tres direcciones para hacer un inóculo uniforme, Se dejan las cajas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que se seque el inóculo y se colocan después los discos utilizando unas pinzas previamente flameadas, se presionan éstos para que se adhieran a la superficie del agar y se incuban finalmente las cajas en los 30 minutos siguientes a su inoculación (5). Después del período incubación de 18 a 24 horas, se miden los halos de inhibición de cada antibiótico traduciéndose estos valores como resistente, susceptible o susceptibilidad intermedia, de acuerdo con las tablas de referencia. (3.3)

Precauciones: El agar de Mueller/Hinton deberá tener un grosor en las cajas de 5 a 6 mm., antes de utilizarse se seca durante 30 minutos y sólo se usarán cuatro días después de su preparación; el pH correcto del medio (7.4) deberá verificarse por el laboratorio. Antes de inocular el agar debe exprimirse el hisopo comprimiéndolo contra las paredes internas del tubo.

Errores comunes y control de calidad.

En las pruebas de susceptibilidad en disco, se requiere de un estricto control de calidad, para obtener resultados útiles y reproducibles. La mejor forma de hacerlo es seguir la técnica tal y como se ha establecido, utilizar el material y equipo apropiados, incluir microorganismos de susceptibilidad conocida como control de calidad, medir correctamente el diámetro de las zonas de inhibición, interpretarlas en forma correcta y transcribirlas sin error.

La falta de un estricto control de calidad puede ocasionar una o varias fallas comunes que se cometen con esta técnica, como pueden ser las siguientes.

- 1.- Utilizar un medio diferente al de Mueller Hinton, usar un medio caduco o mal preparado, no controlar su pH.
- 2.- No ajustar el inóculo.

- 3.- Utilizar un estándar de Mac Farland inexacto como referencia de turbiedad.
 - 4.- No exprimir el hisopo cargado con el inóculo antes de sembrarlo.
 - 5.- Tiempo excesivo entre preparación del inóculo y su sembrado.
 - 6.- Uso de discos caducos o mal conservados.
 - 7.- Tiempo prolongado entre el sembrado del medio y la aplicación de discos.
 - 8.- Retardo en la incubación después de la inoculación.
 - 9.- Utilizar inóculos mixtos.
 - 10.- Utilizar la técnica para microorganismos que requieren incubación anaerobia o que sean de crecimiento lento.
- 3) Automatizadas: La automatización en el laboratorio clínico se ha extendido a las pruebas de susceptibilidad. Las ventajas teóricas de estos sistemas son, entre otras, la disminución de errores ocasionados por variaciones en las técnicas manuales, su mayor reproducibilidad, rapidez en los resultados y reducción de costo de la prueba. Existen dos equipos automatizados autorizados por la FDA,

que además de practicar pruebas de susceptibilidad pueden adaptarse para hacer la identificación de los microorganismos.

RANGOS DE LAS ZONAS DE INHIBICION PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA CON DISCOS.

AGENTE ANTIMICROBIANO	POTENCIA DEL DISCO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION (mm)	
		<u>S. aureus</u> ATCC 25923	<u>E. coli</u> ATCC 25922
AMPICILINA	10 microgramos	24-35	15-20
BACITRACINA	10 unidades	17-22	-
CARBENICILINA	100 microgramos	-	-
CEFALOSPORINA	30 microgramos	25-37	18-23
CLORAMFENICOL	30 microgramos	19-26	21-27
CLINDAMICINA	2 microgramos	23-29	-
ERITROMICINA	15 microgramos	22-30	8-14
GENTAMICINA	10 microgramos	19-27	19-26
KANAMICINA	30 microgramos	19-26	17-25
NEOMICINA	30 microgramos	18-26	17-23
PENICILINA	10 unidades	26-37	-
POLIMIXINA B	300 unidades	7-13	12-16
TETRACICLINA	30 microgramos	19-28	18-25
TRIMETOPRIN-SULFAMETOXASOL	1.25-23.75 ug	24-32	24-32
VANCOMICINA	30 microgramos	15-19	-

RANGOS DE LAS ZONAS DE INHIBICION PARA PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA CON DISCOS

PARA Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

AGENTE ANTIMICROBIANO	POTENCIA DEL DISCO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION (mm)
GENTAMICINA	10 microgramos	16-22
CARBENICILINA	100 microgramos	19-25
CLORAMFENICOL	30 microgramos	6-12
TOBRAMICINA	10 microgramos	19-25
POLIMIXINA B	300 unidades	13-18
TETRACICLINA	30 microgramos	6-14

TABLA 3.3 b

3.4. Cepario de microorganismos aerobios y anaerobios.

Los tres métodos más utilizados para la conservación de microorganismos son: (1) Liofilización, (2) Congelación y ultracongelación y (3) Uso de medios apropiados para conservación a corto plazo. (6), (12), (19), (20), (21), (29).

(1) Liofilización es el método más confiable, pero también el más elaborado, ya que requiere de equipo especial. Este proceso consiste en la deshidratación de suspensiones bacterianas congeladas sometidas a bajas presiones, con lo que el agua pasa del estado sólido al gaseoso sin pasar por el líquido. El equipo más simple para realizar la liofilización consiste en un desecador, que además mantiene congelada la cepa mientras dura el proceso, y una bomba de vacío.

Sólo se mencionarán los aspectos principales en la conservación por este método.

- a) Selección de viales.
- b) Selección del agente crioprotector.
- c) Preparación y propagación de la cepa.
- d) Liofilización.
- e) Almacenamiento.
- f) Rehidratación de las cepas liofilizadas.

Las ventajas que presenta este método son las siguientes: las bacterias liofilizadas pueden almacenarse durante largo tiempo si se mantienen en condiciones que eviten el oxígeno, humedad y luz.

La mayoría de las especies bacterianas permanecen viables y sin alterar sus características de cultivo, morfología y propiedades bioquímicas. Se puede utilizar para aerobios y anaerobios.

2) Congelación y ultracongelación, se obtienen diferentes resultados - según las diversas especies, algunas bacterias soportan perfectamente la congelación y, otras como Neisseria y Haemophilus, son muy sensibles a ella. Existen diferentes medios de soporte que actúan como crioprotectores (como la leche descremada), en general no es conveniente tener altas concentraciones de electrolitos; la velocidad de enfriamiento debe ser lenta al principio (hasta 4°C) y rápida de 4°C a 70°C. - El período de conservación va de seis meses a dos años, pero se reduce grandemente cuando las cepas se congelan y descongelan varias veces, por ejemplo, por interrupciones en la energía eléctrica.

La ultracongelación es el método que emplea nitrógeno líquido a una temperatura de -90°C. La experiencia de la American Type Culture Collection (ATCC) indica que este procedimiento permite la conservación por períodos mayores de quince años, pero tiene la desventaja de su -

costo elevado y personal altamente especializado.

(3) Uso de medios apropiados. Para la conveniencia del trabajo diario, puedan mantenerse muchos microorganismos conservando su viabilidad y estabilidad durante largos períodos sin permitir el excesivo crecimiento y con baja actividad metabólica. Los siguientes medios son los más recomendados para la conservación de microorganismos:

1.- Cisteína tripticasa agar (CTA).

Es un medio sin carbohidratos y semisólido el cual permite el desarrollo de microorganismos por largos períodos a temperatura ambiente; - los microorganismos pueden sobrevivir algunas semanas o años, dependiendo de su metabolismo, pudiendo verificarse su viabilidad cada dos o tres meses por subcultivo en un medio apropiado, si el desarrollo es escaso pero conserva sus características típicas, se transfiere a un nuevo tubo de CTA. Si el cultivo no está en buenas condiciones o si el crecimiento es atípico, debe descartarse y obtenerse uno nuevo.

2.- Tripticasa soya agar (TSA)

Muchos microorganismos como estafilococos y enterobacterias, pueden mantenerse por años inoculándolas por picadura en medio de tripticasa soya agar, los tubos son sellados con parafina colocando previamente un tapón de corcho.

3.- Agar inclinado de chocolate o sangre.

Los microorganismos de difícil desarrollo como neumococos y estreptococos, pueden mantenerse en tubos de gelosa sangre o chocolate, con tapones de rosca y en refrigeración. Estos cultivos deben transferirse cada dos o tres semanas en una nueva placa de sangre para comprobar su viabilidad y morfología, y luego a un nuevo tubo inclinado de sangre o chocolate. Haemophilus influenzae puede almacenarse por subcultivo diario en agar fresco de chocolate, estos tres microorganismos también pueden almacenarse a temperatura ambiente si se subcultivan cada semana. Neisseria gonorrhoeae puede conservarse por subcultivo diario en agar fresco de chocolate, pero estos microorganismos no sobreviven a subcultivos repetidos.

.- Medio de carne picada.

Este es un medio apropiado para el mantenimiento tanto de aerobios como de anaerobios y de facultativos. Después de la inoculación, los cultivos se almacenan a temperatura ambiente en envases cerrados, aunque el medio puede mantener a los microorganismos por largos períodos, debe verificarse su viabilidad cada dos o tres semanas.

3.4.1 Microorganismos aislados en el laboratorio.

La conservación de microorganismos aislados en el laboratorio, dependerá de los fines para los que se utilizarán. Pueden emplearse para el control de calidad de medios y reactivos si no se cuenta con cepas de referencia, para proyectos de investigación, rectificación o aclaración que tenga que hacerse en cepas aisladas de pacientes o, simplemente, para contar con una variedad de microorganismos aislados de muestras clínicas.

El método dependerá de los recursos del laboratorio.

3.4.2 La utilidad de la American Type Culture Collection (ATCC) en el control de calidad de Microbiología.

La American Type Culture Collection (ATCC) está dedicada a la colección, preservación y distribución de cultivos perfectamente caracterizados de microorganismos vivos y células animales. (10)

Sus propósitos de investigación están enfocados a mejorar los métodos de caracterización y preservación de cultivos. También provee información técnica del área y desempeña un papel importante en la enseñanza, educación, biociencia e industrias.

La ATCC fué establecida por el doctor C.E.A. Wilslow en 1911 como -

"Bacteriological Collection and Bureau for the Distribution of Bacterial Cultures". En el Museo de Historia Natural de la Ciudad de Nueva York, está el primer catálogo publicado en 1912 que constaba de 578 cepas de bacterias y hongos.

Los catálogos de la ATCC están disponibles a solicitud y contienen información de los especímenes, así como recomendaciones de los medios de cultivo utilizados, temperatura de incubación, historia del cultivo y algunos de sus usos prácticos.

El empleo de las cepas de referencia de la ATCC es uno de los apoyos más importantes en los programas de control de calidad en Estados Unidos de Norte América; sin embargo, nuestro país no cuenta con una institución como ésta, por lo tanto se tiene que recurrir a su importación o solicitarlas de instituciones de investigación, enseñanza o asistencia, de prestigio, aunque en estos casos la caracterización de la cepa habitualmente es incompleta.

3.5 Tinciones.

Los reactivos y colorantes empleados en las tinciones deben reunir los requisitos mencionados en los capítulos 3.2.1 y 3.2.2.

De las tinciones utilizadas en el laboratorio de Microbiología, la más frecuente es la de Gram, existen también tinciones especiales como la de azul de metileno de Loeffler, la de bacilos ácidos alcohol resistentes (Ziehl Neelsen), las de esporas, cápsula, flagelos, etc.

Para realizar una tinción, es importante preparar una suspensión de colonias o de la muestra original con una densidad adecuada. Una forma práctica de saber si la densidad es la correcta es que debe ser posible leer letra impresa através de la suspensión, posteriormente se deja secar a temperatura ambiente y luego al calor, en esta forma se evita que la suspensión se desprenda del portaobjetos durante el procedimiento. El calor no debe ser intenso ya que se podría alterar la morfología bacteriana y las afinidades tintoriales, el deseable es aquel con el que el portaobjetos puesto sobre el dorso de la mano, comience a ser intolerable (aproximadamente 45°C). (12)

3.5.1 Tiempo de reacción.

Cada uno de los procedimientos de tinción tiene un tiempo perfectamente establecido, el cual debe respetarse para asegurar una tinción de buena calidad. Es importante conocer el fundamento de la tinción que se va a realizar para poder valorar mejor el resultado final.

3.5.2 Control con microorganismos conocidos.

El control de calidad de las tinciones se tiene que realizar con microorganismos de los cuales se conoce su morfología y su reacción habitual a la tinción. (21)

Si los colorantes se utilizan a diario como es el caso de la tinción de Gram, se deben hacer controles todos los días antes de teñir las preparaciones problema y ocasionalmente cuando se va a probar un colorante recién preparado.

Para tinciones que no se realizan frecuentemente, se deben de revisar los colorantes periódicamente y hacer la prueba con microorganismos que den la tinción positiva o negativa para asegurar que los reactivos son efectivos todavía. También se deben realizar controles cuando se noten precipitaciones en los colorantes, o señales de turbiedad en el agua o solución salina empleadas para hacer los frotis, ya que pueden estar contaminados y dar resultados falsos al realizar el trabajo de rutina.

4. EVALUACION DEL TRABAJO DEL LABORATORIO.

Es necesario mantener una vigilancia constante y permanente sobre los aspectos administrativos, recursos materiales, eficiencia del personal, rutinas de trabajo y manejo de resultados. Esta evaluación debe hacerse en condiciones normales de trabajo y sería poco útil e impráctico controlar cada uno por separado, por lo que resulta más conveniente revisarlos en conjunto. Para ello pueden utilizarse especímenes clínicos de pacientes ficticios que ingresan al laboratorio como cualquier estudio de rutina (Cultivos ciegos), o bien cultivos de identidad desconocida para el personal del laboratorio que se les entrega deliberadamente para que sean identificados (cepas de identidad desconocida), la revisión diaria de resultados preliminares o finales y revisión semestral o anual de toda la información generada en el laboratorio, son otras alternativas para controlar no solamente la calidad del trabajo, sino todo el proceso administrativo relacionado con la recepción de muestras y su manejo posterior.

4.1 Cultivos ciegos.

Se utilizará una muestra clínica real o simulada que se ha contaminado con una o varias especies bacterianas y se llena la solicitud con un nombre ficticio del paciente o usando el nombre de un paciente fa-

llecido y se le da entrada en el laboratorio como cualquier otro estudio de rutina. Para la simulación de los especímenes se puede utilizar, mucina gástrica para esputo, sangre de carnero diluída con algún caldo con características parecidas a ésta, o un líquido claro para simular orina o algún líquido orgánico (2). La persona que haga este control de calidad estará pendiente de supervisar el camino seguido por la muestra desde su recepción hasta el reporte final.

Este tipo de control permite evaluar en conjunto el sistema administrativo, las rutinas de trabajo, la eficiencia del personal en el trabajo de rutina, así como el manejo de la información preliminar y final. Para no despertar sospechas, es conveniente solicitar la colaboración de un médico para que reciba la información.

La frecuencia con la que se realice dependerá del funcionamiento del laboratorio, siendo aconsejable que se haga una vez por semana. Los resultados de la identificación no deben informarse al personal del laboratorio a menos de que éstos hayan sido incorrectos o la muestra se haya manejado equivocadamente. Los errores encontrados deberán discutirse con las personas interesadas, buscando medidas para su corrección. (31)

4.2 Cepas de identidad desconocida.

Idealmente, una institución relacionada con el laboratorio clínico debería tener este control de calidad externo, manteniendo un cepario perfectamente identificado para que enviara una vez al mes, a los laboratorios interesados, una cepa de referencia liofilizada, para que fuera identificada. El laboratorio remitirá su respuesta final a la institución, la cual sería calificada y los resultados dados a conocer a los laboratorios. (16), (24).

Si esta institución no existe, la persona encargada del control de calidad debe obtener esta cepa de algún laboratorio calificado o de referencia y se entrega deliberadamente al responsable de Microbiología para que sea identificada en un plazo prudente.

El propósito de este control es el de evaluar los conocimientos teóricos, la destreza y la acuciosidad del personal del laboratorio y los recursos materiales de éste.

El resultado correcto e incorrecto de la identificación debe ser informado al personal del laboratorio y servir como tema de discusión para la educación continua del personal y corrección de errores en la rutina de trabajo.

4.3 Revisión diaria de resultados.

El control de calidad en Microbiología se inicia desde que se recibe la muestra y termina hasta que el resultado del estudio llega al médico o al expediente clínico del paciente. Por ser las hojas de resultados el único contacto que muchas veces tiene el médico con el laboratorio, se justifica revisarlos diariamente con el propósito de corregir cualquier error que pudiera quedar impreso en ellos; todos los recursos invertidos en un cultivo se perderán si el resultado no está correctamente expresado.

La revisión diaria de resultados, consiste en la inspección y verificación de toda la información escrita emitida por el laboratorio. Los puntos más importantes que deben inspeccionarse son los siguientes:

- 1.- Revisar que lo informado en el resultado sea congruente con lo solicitado por el médico.
- 2.- Revisar que el laboratorio haya realizado todo lo solicitado por el médico.
- 3.- Verificar la identificación de los microorganismos encontrados, especialmente de los que no se aíslan frecuentemente.
- 4.- Comprobar que el resultado sea expedido en un tiempo apropiado pa

ra el tipo de estudio solicitado. Investigar cualquier estudio terminado antes o después del tiempo de trabajo establecido por laboratorio.

- 5.- Corregir cualquier error ortográfico.
- 6.- Investigar si se mandó informe preliminar.
- 7.- Inspeccionar el uso apropiado de sellos de información estampados en el resultado.
- 8.- Revisar que esté el nombre de la persona que trabajó el estudio.
- 9.- Verificar que los halos de inhibición del antibiograma estén correctamente interpretados.

La inspección de los resultados debe hacerla de preferencia el jefe o encargado del laboratorio; en su ausencia, deberá realizarla el supervisor de la sección o cualquier persona interesada en el control de calidad y con experiencia en la materia.

Es aconsejable que este control se realice al terminarse los estudios del día, antes de que los resultados sean entregados, sin que ello signifique un retraso en su distribución. Cualquier incongruencia o error no sólo debe corregirse sino que además debe discutirse y así evitar errores futuros. (cuando esta aclaración se hace amigablemente funciona como educación continua)

El resultado final es la imagen que el médico tendrá de la calidad del trabajo del laboratorio, es necesario entonces asegurarse de que sea impecable y esté ausente de cualquier error.

4.4. Revisión periódica de resultados.

Toda la información generada por el laboratorio debe mantenerse archivada y completa para que, periódica, semestral o anualmente, se concentre en tablas para obtener la variedad de especies identificadas, la frecuencia con que se reciben los diferentes tipos de especímenes, el porcentaje de aislamiento de cepas en relación a las muestras clínicas, o con los servicios y pisos del hospital.

Mediante un análisis crítico y estadístico de esta información, el laboratorio puede evaluar la eficiencia de sus recursos materiales y humanos, la calidad y variedad de las muestras que recibe, el volumen de trabajo realizado, y el porcentaje de positividad en los cultivos.

La información analizada es conveniente que se difunda dentro de la institución para que la utilice el personal médico y paramédico con propósitos estadísticos, clínicos, epidemiológicos, etc.

5.- PROCEDIMIENTOS PARA LA CALIBRACION, MANTENIMIENTO Y MANEJO DE EQUIPO.

El correcto funcionamiento del equipo es un aspecto importante en un programa de control de calidad.

Se puede establecer un mantenimiento preventivo con las recomendaciones de los fabricantes, teniendo en cuenta antes de adquirir uno nuevo lo siguiente:

- 1.- Averiguar si se cuenta con refacciones, cuando menos para los siguientes cinco años después de adquirido el equipo.
- 2.- Conocer todos los posibles usos del aparato, para obtener de él un máximo rendimiento.
- 3.- Solicitar al fabricante una demostración de su funcionamiento y mantenimiento, debiéndose contar además con un manual donde se indique lo anterior.

Algunos aparatos, además del mantenimiento rutinario, requieren de una calibración o verificación periódica realizada por el personal técnico especializado para certificar su correcto funcionamiento (11).

Autoclaves.

Para el correcto funcionamiento, debe expulsarse al inicio del procedimiento todo el aire de la cámara del autoclave; si esto no se hace, la presión requerida y la distribución de la temperatura serán irregulares.

La presión, temperatura y tiempo de esterilización de cada procedimiento, deben registrarse en una hoja apropiada a lo largo del día incluyendo también en el registro, el número del lote esterilizado, su contenido, así como el nombre de la persona que llevó a cabo el procedimiento.

Baños de agua.

Generalmente se utiliza para incubaciones a corto tiempo, de medios de cultivo, muestras en estudio y reactivos.

Todos los baños de agua están equipados con un termostato que puede mantener la temperatura con una fluctuación de $\pm 0.5^{\circ}$ C.

Debe utilizarse agua destilada o desionizada para evitar depósitos minerales en el interior para, a su vez, evitar contaminaciones.

Autoclaves.

Para el correcto funcionamiento, debe expulsarse al inicio del procedimiento todo el aire de la cámara del autoclave; si esto no se hace, la presión requerida y la distribución de la temperatura serán irregulares.

La presión, temperatura y tiempo de esterilización de cada procedimiento, deben registrarse en una hoja apropiada a lo largo del día incluyendo también en el registro, el número del lote esterilizado, su contenido, así como el nombre de la persona que llevó a cabo el procedimiento.

Baños de agua.

Generalmente se utiliza para incubaciones a corto tiempo, de medios de cultivo, muestras en estudio y reactivos.

Todos los baños de agua están equipados con un termostato que puede mantener la temperatura con una fluctuación de $\pm 0.5^{\circ}$ C.

Debe utilizarse agua destilada o desionizada para evitar depósitos minerales en el interior para, a su vez, evitar contaminaciones.

Centrifugas.

A estos aparatos se les debe determinar las revoluciones por minuto a las que funcionan mediante el uso de tacómetros. Deben tener un mantenimiento regular del sistema eléctrico, así como de limpieza y descontaminación.

Refrigeradores.

Todos los refrigeradores deben inspeccionarse regularmente, la temperatura debe registrarse diariamente, de preferencia al empezar el día de trabajo, para así determinar las condiciones en que está funcionando el refrigerador o el congelador. La limpieza y descontaminación - deben realizarse a intervalos regulares, anotando en hojas de mantenimiento cuándo se realizaron éstas.

Microscopios (Instalaciones).

El local debe tener bastante luz, limpio, con el mínimo tránsito posible de personas. Debe procurarse que la iluminación sea indirecta, a través de cortinas delgadas y claras, o de ventanas con vidrios translúcidos; de preferencia que se cuente con un extractor y disponga de - mesas fijas y estables.

Precauciones.

No deben consumirse alimentos al manejar o reparar equipo y evitar trabajar cerca de parrillas, estufas, mecheros, recipientes que contengan o despidan gases o sustancias corrosivas, pues son perjudiciales para el sistema óptico del microscopio. No se deben presionar los componentes ópticos al limpiarlos y secarlos.

Manejo.

No se deben forzar los sistemas de enfoque macro y micro si llegan a trabarse, para evitar daños mayores a piñones, engranes y cremalleras, así como a la palanca del diafragma del condensador porque daña las laminillas. Para realizar el enfoque se debe observar lateralmente el tubo óptico del microscopio, acercar el objetivo a la muestra y enfocar correctamente, evitando así daño a la muestra y al objetivo. La lámpara debe mantenerse apagada mientras no se use el microscopio.

Mantenimiento.

Para realizar el mantenimiento se debe disponer de tiempo suficiente para iniciar y terminar la limpieza del microscopio. Se contará con herramientas, materiales y sustancias adecuadas para la limpieza de los componentes ópticos y mecánicos del microscopio. Se revisarán y lubricarán los mecanismos móviles por lo menos cada seis meses. El sistema óptico se debe limpiar diariamente.

No se dejará el aceite de inmersión en el objetivo cuando el microscopio no se va a usar durante algún tiempo. No se aconseja el empleo repetido de solventes, como el xilol, para quitar el aceite del lente, porque ello aflojará el cemento que la sostiene. Sólo se usará papel especial para la limpieza de la lente para quitarle el aceite; otros resultan demasiado ásperos y pueden rayarla. Para evitar el polvo se limpia el microscopio con una franela y se cubre con su bolsa protectora al terminar de utilizarlo.

Balanzas.

Para la instalación de una balanza deben buscarse las condiciones adecuadas. No deberá estar en un lugar transitado o cerca de una ventana dado que existe el peligro de que se caliente por la influencia directa del sol, no debe haber cerca de ella aparatos que irradien calor, porque también producen corrientes de aire caliente.

Las mesas para colocar las balanzas deben ser firmes, para esto, las placas de piedra han dado buenos resultados pues anulan vibraciones.

La iluminación más apropiada es la artificial, en un lugar sin ventanas, las lámparas deberán situarse a suficiente distancia de la mesa, para evitar las radiaciones de calor.

Algunas de las indicaciones anteriores también se deben seguir cuando se empleen balanzas granatarias.

Las causas que originan errores de pesado pueden dividirse en dos grupos.

- 1.- Modificaciones del peso del material que debe pesarse, como consecuencia del aumento aparente de la masa (película de agua, humedad, impurezas).
- 2.- Modificaciones aparentes del peso debidas a la presencia de fuerzas suplementarias (empuje causado por el aire, fuerzas electroestáticas).

Procedimiento para el uso de la balanza analítica.

- 1.- Seleccionar un lugar firme y apropiado.
 - a) sin corrientes de aire
 - b) a una temperatura de 20 a 22° C de preferencia.
- 2.- Seleccionar el voltaje apropiado (110 o 220 v).
- 3.- Nivelar la balanza con los tornillos niveladores.
- 4.- Asegurar la posición de las pesas, girando los seleccionadores de pesas de 0 a 0.

- 5.- Asentar las partes de balanceo (medio tiro o prepesada).
- 6.- Localizar la imagen de la escala en la pantalla.
- 7.- Ajustar el peso correcto de 0-100, usando el marco de pesas.
- 8.- Cuando la balanza se mueva de lugar centrar nuevamente el cero en la pantalla.
- 9.- Cubrir la balanza con su bolsa o con una franela limpia al terminar de usarla.

Jarras de Gas-pack.

Es un sistema de jarra hermética para crear una atmósfera de anaerobiosis y está constituido por los siguientes elementos:

- a) Una jarra de policarbonato.
- b) Un sobre generador de hidrógeno y bióxido de carbono.
- c) Un indicador desechable para anaerobiosis.
- d) Catalizador (perlas de paladio).

Además se debe de contar con un desecador para almacenar las perlas - mientras que estas no se utilicen.

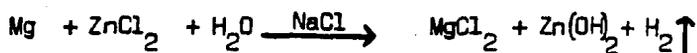
Para que el sistema funcione satisfactoriamente todos los elementos antes mencionados deben estar en perfecto estado.

La jarra no debe tener soluciones de continuidad, para proteger su superficie se debe evitar el contacto con materiales abrasivos, solventes y el uso de detergentes. Si es necesario, se puede esterilizar en autoclave a 121° C (15 lb) por quince minutos.

El indicador de anaerobiosis debe estar en buen estado ya que es el que nos mostrará si existe la atmósfera correcta.

El catalizador de paladio debe ser activado por calentamiento seco cada vez que se utilice (160° C durante 1 a 2 horas) y después se almacena en un desecador.

La reacción que se lleva a cabo en el interior de la jarra y que crea la anaerobiosis es la siguiente: el sobre generador produce hidrógeno mediante la siguiente reacción:



el cual reacciona con el oxígeno en presencia del catalizador de paladio formándose agua, el aire de la jarra pierde así su oxígeno.

Cuando se ha conseguido una correcta atmósfera de anaerobiosis se debe producir agua condensada que aparecerá como una neblina visible sobre la pared interna de la jarra y la tapa donde se encuentra el catalizador estará caliente, si esto no ocurre dentro de los primeros veinticinco minutos habrá que revisar todo el sistema. Después de una incu

bación de 18 a 24 horas, el indicador de azul de metileno aparecerá -
incolore.

Como el hidrógeno es un gas explosivo habrá que tomar precauciones du-
rante su empleo para evitar así un accidente. No se debe manejar la-
jarra cerca de mecheras y si se observan grietas, se debe desechar.

Incubadoras.

En las incubadoras se requiere controlar la temperatura y la humedad y, en algunas, la concentración de CO_2 .

La temperatura se ajusta para cada incubadora según sea el uso que se le da, o el tipo de microorganismo que se pretenda aislar. A la temperatura deseada se le da una tolerancia de $\pm 3^\circ\text{C}$, para propósitos bacteriológicos la temperatura promedio es de 35°C . Debe registrarse en una gráfica la temperatura diaria de la incubadora al empezar el día de trabajo.

En el interior, la humedad debe conservarse entre un 40 a 70%, esto se logra colocando una charola con agua en el piso de la incubadora para propiciar así su evaporación y humidificar el ambiente; se evita así la deshidratación del agar de los medios sólidos.

En las incubadoras con ambiente de CO_2 , la concentración de este gas (5-10%) se mantiene constante gracias a un sensor colocado en el interior y la medición se expresa en un control que está en el exterior de la incubadora. Es importante controlar y registrar estos parámetros al inicio de las actividades del día. (2), (6), (11), (12).

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y EQUIPO

A continuación se enumeran los medios de cultivo utilizados durante el desarrollo del estudio. La preparación de cada uno de ellos se lleva a cabo según las especificaciones del marbete de la casa comercial. También se enlistan los reactivos empleados en los procedimientos que se sujetaron a control de calidad, así como el equipo que se utilizó.

EQUIPO

- 1.- Autoclave para esterilizar a 121° C.
- 2.- Incubadora.
- 3.- Refrigerador.
- 4.- Baño de agua.
- 5.- Platina calentadora con agitador magnético.
- 6.- Balanza analítica.
- 7.- Balanza granataria.

MEDIOS DE CULTIVO

- 1.- Agar sangre Columbia (BIOXON)
- 2.- Agar Mac Conkey (BIOXON)
- 3.- Agar Salmonella Shigella (BIOXON)
- 4.- Agar Hektoen enteric (BIOXON)
- 5.- Agar chocolate (DIFCO)

- 6.- Agar Thayer-Martin (DIFCO)
- 7.- Agar Mueller-Hinton (BIOXON)
- 8.- Agar triple azucar hierro (BIOXON)
- 9.- Agar lisina hierro (BIOXON)
- 10.- Agar citrato de Simmons (BIOXON)
- 11.- Agar semisólido MID (movilidad-indol-ornitina) (DIFCO)
- 12.- Agar semisólido SIM (sulfhídrico-indol-movilidad) (BIOXON)
- 13.- Caldo MR VP (BIOXON)
- 14.- Agar ceftrimida (MERCK)
- 15.- Agar tech (BIOXON)
- 16.- Caldo tripticasa soya (BIFCO)
- 17.- Caldo tioglicolato (DIFCO)
- 18.- Caldo Todd-Hewitt (BIOXON)
- 19.- Agar tripticasa soya (DIFCO)
- 20.- Caldo Gram negativos GN (BIOXON)
- 21.- Agar Sabouraud (BIOXON)
- 22.- Medio de Lowenstein-Jensen (comercial) (BIOXON)
- 23.- Medio para Hemocultivo Bioclin (comercial) (BIOCLIN)

REACTIVOS

Reactivo de Kovac

p-dimetilaminobenzaldehido (MERCK) 10 g
 Alcohol isoamílico (MERCK) 150 ml
 HCl concentrado (MERCK) 50 ml

Reactivo de Voges-Proskauer

alfa naftol (SIGMA) 0.5 g
 alcohol etílico (MERCK) 100 ml
 KOH al 40% (MERCK)

Reactivo de oxidasa

N-N-dimetil-p-ferilén-diamino 1 g
 agua destilada 100 ml

Plasma para la prueba de coagulasa

Mezcla de plasma obtenidos de las pruebas de coagulación de la sección
 de Hematología (Anticoagulante oxalato de sodio).

Reactivo de catalasa

Agua oxigenada H_2O_2 al 30%

Discos para las pruebas de susceptibilidad

Multidisco para Gram positivos (BIOCLIN)

Multidisco para Gram negativos (BIOCLIN)

Unidiscos de tobramicina y amikacina (ELI LILLY Y BRISTOL)

Discos de bacitracina (BIOCLIN)

Discos de optoquina (BIOCLIN)

Colorantes para la tinción de Gram

cristal violeta (MERCK)

Iugol

alcohol-acetona

safranina (MERCK)

Sueros antiespecie de:

Salmonella: Grupo B₁, C, A, polivalente y Vi (BECTON DICKINSON)

Shigella: Grupo A, B, C, D (BIOCLIN)

Sistema de coaglutinación para estreptococo (Phadebact) (ANDRE BIGAUX)

Bioindicadores para esterilización en autoclave (ATTEST)

METODOLOGIA

El control de calidad se realizó de marzo de 1982 a junio de 1983, no todas las pruebas se iniciaron en marzo debido a la falta de material.

Las pruebas que comprendió el control de calidad son: esterilidad y efectividad de medios de cultivo, registro diario de temperatura del refrigerador e incubadora, pruebas de indol, catalasa, coagulasa, tinción de Gram y susceptibilidad antimicrobiana. Se evaluaron los sueros antiespecie de Salmonella, Shigella, el equipo de coagulación para identificación de estreptococo (Phadebact), efectividad de los discos de bacitracina y optoquina, funcionamiento del autoclave mediante esporas de B. sthearotermophilus y la revisión periódica de resultados.

Pruebas de esterilidad

Se realizó tanto en medios preparados en el laboratorio como en los adquiridos comercialmente. Los medios se preparan cada semana, el número de controles para el dato de esterilidad dependerá de la cantidad producida en cada lote y del tipo de medio (enriquecido o selectivo).

Las cajas y tubos seleccionados para el control de esterilidad se incuban durante 24 horas a 35°C, el resto del lote permanece a temperatura ambiente. Después del período de incubación se determina si hay contaminación en las cajas y tubos, si existe se obtiene el porcentaje de medios contaminados en base a los controles que se contaminaron, e

indica que aproximadamente el resto del lote mostrará contaminación. En lo que respecta a los medios adquiridos comercialmente, se sigue el mismo procedimiento cuando se reciben en el laboratorio.

Pruebas de efectividad

Todos los medios están sujetos a las pruebas de efectividad para autorizar su utilización. Cada uno de los medios se prueba con microorganismos positivos y negativos conocidos (tabla 3.1.4.), los resultados se interpretan de la siguiente manera: (+) se obtuvo la reacción esperada y (-) no se obtuvo la reacción esperada.

Registro diario de temperatura

El registro diario de temperatura se llevó a cabo en la incubadora y refrigerador en gráficas que se encuentran pegadas en la puerta de ambos. La temperatura siempre se registra al empezar el día de trabajo.

Prueba de indol

La reacción de indol se realiza mediante una técnica rápida en papel filtro, en una caja de Petri se coloca el papel filtro, se impregna del reactivo de Kovac y mediante el asa se frota con el control positivo E. coli (color rosa) y el control negativo Klebsiella pneumoniae (no hay color).

Prueba de catalasa

Se realiza en portaobjetos colocando una gota de agua oxigenada y con el asa el microorganismo que se quiera probar, control positivo Staphylococcus aureus, habrá producción de burbujas y el control negativo estreptococo, no hay ninguna reacción. La asada del microorganismo de prueba no debe provenir de un medio que contenga eritrocitos, ya que puede haber falsos positivos.

Prueba de oxidasa

Se realiza en una caja Petri, se coloca el papel filtro, se impregna del reactivo para oxidasa, los microorganismos que servirán como controles deberán provenir de cultivos recientes, con el asa de toma una colonia y se frota en el papel filtro, una reacción positiva se indica por el cambio de color de rosa a negro (Pseudomonas aeruginosa), cuando la reacción es negativa no hay ningún cambio de coloración (E.coli).

Prueba de coagulasa

La mezcla de plasmas utilizados para la prueba de la coagulasa, se obtiene de las pruebas de coagulación de la sección de Hematología, ésta se realiza con microorganismos de reacción conocida: Staphylococcus aureus coagulasa positiva y Staphylococcus epidermidis coagulasa negativa. La prueba se efectúa con 1 ml de plasma, se suspenden las co-

lonias bien aisladas y se incuba en baño de agua a 37° C durante cuatro horas, una reacción positiva se indica por la presencia de un coágu-
gulo, y negativa el plasma permanece igual.

Pruebas de susceptibilidad

Las pruebas de susceptibilidad se realizan con tres cepas de referencia E. coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 25923 y Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, siguiendo la técnica de Kirby-Bauer (3.1.4.), - estos controles se realizan a diario, se emplea multidisco para Gram -
negativos (E.coli), multidisco para Gram positivos (Staphylococcus aureus) y unidiscos de tobramicina y amikacina para Pseudomonas aerugi-
nosa. A los resultados de los halos de inhibición se aplica análisis -
estadístico: media aritmética (X), desviación estándar (S) y coeficien-
te de variación (C.V.), se agrupan los resultados por mes y por lote -
de los discos.

Sueros antiespecie

Los sueros antiespecie que se evalúan son para Salmonella y Shigella, se contó con 15 cepas de Salmonella typhi y 20 de Shigella dysenteriae, Shigella flexneri y Shigella sp. (identificadas por el MICRO-ID y obte-
nidas de un laboratorio de referencia de E.U.), la serotipificación se realiza de la siguiente manera.

- 1) El cultivo deberá ser reciente, de preferencia no deberá provenir de un medio selectivo, se suspende 3 a 4 colonias en 0.5 ml de solución salina estéril para formar una suspensión densa ligera.
- 2) Se pone una gota de los sueros antiespecie en secciones separadas de una caja Petri vacía, se agrega una gota de la suspensión bacteriana y se mezclan con un aplicador de madera, al mismo tiempo una gota de la suspensión bacteriana se mezclará con una gota de solución salina y se leerá como control negativo.
- 3) La caja Petri deberá inclinarse suavemente en forma rotatoria y se observará la aglutinación macroscópica en un minuto, la aglutinación que se presente después de dos minutos se considerará negativa.
- 4) Si el aislamiento de Salmonella tipifica con el suero antiespecie Vi y no con el polivalente, en este caso el antígeno Vi puede enmascarar a los antígenos somáticos; para evitarlo, la suspensión bacteriana se deberá hervir durante una hora y retipificarse con el suero polivalente y específico de grupo.
- 5) Si el aislamiento de Shigella no tipificó con los sueros antiespecie, la suspensión bacteriana se hervirá durante media hora para destruir los antígenos termolábiles K que pudieran enmascarar a los

antígenos somáticos y se retipificará.

Coagulación para identificación de Estreptococo

Se emplean cepas de Estreptococo de los grupos A, B, C, G, como microorganismos control (son los grupos que están incluidos en el equipo).

El procedimiento consiste en tener perfectamente aisladas colonias de cultivos recientes, se colocan con una asa sobre unas placas que están incluidas en el equipo, se agrega una gota del reactivo, se homogeniza con un palillo de madera y se realizan movimientos rotatorios, la aglutinación aparecerá en forma de grumos macroscópicos. Se incluye un control negativo que puede ser Estreptococo de cualquier otro grupo. El equipo se prueba cada vez que se utiliza.

Susceptibilidad frente a bacitracina y optoquina

Se utiliza Estreptococo beta hemolítico de grupo A para valorar la efectividad del disco de bacitracina y Streptococcus pneumoniae para el disco de optoquina.

Para los dos microorganismos, el procedimiento consiste en tener colonias aisladas, en caso de no ser así, se incuban de 2 a 4 horas en caldo de TODD-HEWITT una o dos colonias, se realiza una resiembra a una placa de gelosa sangre, procurando que el desarrollo sea homogéneo, se coloca el disco correspondiente presionando para que se haga buen con-

tacto con el medio. Una prueba de susceptibilidad positiva se indica por el halo de inhibición. Tanto Streptococo beta hemolítico de grupo A como Streptococcus pneumoniae son sensibles, respectivamente a ba citracina y optoquina. La prueba se realiza periódicamente durante el uso de los discos.

Evaluación del funcionamiento del autoclave

Se realiza la evaluación del proceso de esterilización mediante el empleo de ampollitas de B.stearothermophilus que se adquieren comercialmente. Las ampollitas se colocan en sitios del autoclave donde se considera que puede no haber buena esterilización. Para evitar contaminación en caso de que las ampollitas se rompan, se colocan en tubos de ensayo, luego de la esterilización se retirarán las ampollitas y se incuban a 55° C durante 24 horas, como control se incubará paralelamente una ampollita no esterilizada (2.1.2). Este procedimiento se llevó a cabo de enero a junio de 1983.

RESULTADOS

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ESTERILIDAD DE MARZO DE 1982 A JUNIO DE 1983

T A B L A I

MEDIOS DE CULTIVO	MESES	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPT.	OCTUB.	NOVIE.	DICIE.	ENERO	FEB.	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
AGAR SANGRE COLUMBIA		66	52	33	16			41.5		45.5	16		16	16	45	16	44
AGAR CHOCOLATE		50	100	75	100	25				5			10				
AGAR MAC. CONKEY																	
AGAR SALMONELLA-SHIGELLA																	
AGAR HENTOEN-ENTERIC		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
AGAR THAYER-MARTIN						5	1			5							
AGAR MUELLER-HINTON			10	25				10						5			
AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO										100							
AGAR LISINA HIERRO										100							
AGAR CITRATO DE SIMONS										100							
AGAR SEMISOLIDO MIO																	
AGAR SEMISOLIDO SIM																	
AGAR CETRIMIDA																	
AGAR TECH																	
AGAR TRIPTICASA SOYA										25					50	75	
CALDO MR-VP																	
CALDO TRIPTICASA SOYA									75	25							
CALDO GRAM NEGATIVOS GN																	
CALDO TIOLICOLATO																	
CALDO TODD-HEWITI																	
AGAR SABOURAUD																	
LOWENSTEIN-JENSEN					50												
BIOCLIN-HEMOCULTIVO													100				



Indica que en esos meses no se contaba con el medio



Las casillas en blanco indican 0% de contaminación



El medio se contaminaba de 3 a 5 días después de su preparación

El número indica % de medios contaminados.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE EFECTIVIDAD DE MARZO DE 1982 a JUNIO de 1983.

T A B L A II

M E D I O	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPT.	DCT.	NOV.	DIC.	ENERO	FEB.	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
AGAR SANGRE COLUMBIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR CHOCOLATE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR MAC. CONKEY	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR SALMONELA-SHIGELLA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGAR HEKTOEN-ENTERIC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AGAR THAYER-MARTIN																
AGAR MUELLER-HINTON	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR LISINA HIERRO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR CITRATO DE SIMONS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR SEMISOLIDO MID	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR SEMISOLIDO SIM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR CETRIMIDA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR TECH							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR TRIPTICASA-SOYA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CALDO MR-VP	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CALDO TRIOTICASA SOYA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CALDO GRAM NEGATIVOS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CALDO TIIOGLICOLATO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CALDO TODD-HEWITT							+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AGAR SABOURAUD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LOWENSTEIN-JENSEN								+	+	+	+	+	+	+	+	+
BIOCLIN HEMACULTIVO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNAasa AGAR	-	-	-													

+ Se obtuvo la reacción esperada al sembrarse el microorganismo control

- La reacción no fué la esperada al sembrarse el microorganismo control

■ No se utilizó el medio en esos meses.

RECOPIACION DE RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DIARIO DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS
DE MAYO DE 1982 A JUNIO DE 1983.

T A B L A III.

PRUEBA	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	
INDOL	+	26	26	26	26	26	25	26	25	25	22	27	26	26	26
	-	26	26	26	26	26	25	26	25	25	22	27	26	26	26
CATALASA	+	26	26	26	26	26	25	26	25	25	22	27	26	26	26
	-	26	26	26	26	26	25	26	25	25	22	27	26	26	26
OXIDASA	+	25/1	26	26	26	21/5	24/1	26	25	25	22	23/4	26	26	26
	-	26	26	26	26	26	25	26	25	25	22	27	26	26	26
COAGULASA	+	26	23/3	21/5	23/3	26	25	26	25	21/4	22	25/2	26	20/6	26
	-	26	26	26	26	26	25	26	25	25	22	27	26	26	26

Los numeros indican los días del mes en que se realizaron las pruebas indicadas (excepto domingo). Donde aparece la diagonal / el número de arriba indica las pruebas positivas y el de abajo las pruebas que resultaron negativas (falsas negativas).

RESULTADOS DEL CONTROL DE CALIDAD DIARIO DE LAS PRUEBAS EFECTUADAS DE MAYO DE 1982
A JUNIO DE 1983

T A B L A IIIa

PRUEBA		POSITIVOS VERDADEROS	FALSOS NEGATIVOS	NEGATIVOS VERDADEROS	FALSOS POSITIVOS
INDOL	716	100%	0	100%	0
CATALASA	716	100%	0	100%	0
OXIDASA	716	96.9%	3.07%	100%	0
COAGULASA	716	93.5%	6.42%	100%	0

Microorganismos utilizados en el control de calidad

INDOL: E. Coli ATCC 25922 (+)
Klebsiella pneumoniae (-)

CATALASA: Staphylococcus aureus
ATCC (+)
Estreptococo (-)

OXIDASA: Pseudomonas aeruginosa
ATCC (+)
E.coli ATCC 25922 (-)

COAGULASA: Staphylococcus aureus
ATCC (+)
Staphylococcus epidermidis
(-)

RECOPILACION DE LOS RESULTADOS DE LA TINCION DE GRAM DE ABRIL DE 1982 a JUNIO DE 1983.

T A B L A IV

MICROORGANISMOS	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO
<u>Staphylococcus aureus</u> +	23	25	24	23	24	23	25	26	23	23	19	27	25	25	26
<u>Staphylococcus aureus</u> +/-	3	2	1	3	2	2	1	0	2	1	1	0	1	1	0
<u>Staphylococcus aureus</u> -	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	3	0	0	0	1
<u>E. coli</u> +	24	25	26	24	26	25	24	25	24	24	23	24	24	26	26
<u>E. coli</u> +/-	2	2	0	2	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
<u>E. coli</u> -	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	2	1	1	0
<u>Staphylococcus aureus</u> +	24	25	26	25	26	25	25	25	26	25	22	24	23	24	24
<u>Staphylococcus aureus</u> +/-	2	2	0	2	1	0	1	1	0	0	1	3	3	2	2
<u>E. coli</u> -	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+ La tinción fué la esperada

+/- En la misma preparación se presentaron los dos tipos de Gram

- La tinción fué lo contrario a la esperada.

RESULTADOS DE LA TINCION DE GRAM EN PORCENTAJE

MICROORGANISMOS	+	+/-	-
<u>S. aureus</u>	92.8%	5.14%	2.05%
<u>E. coli</u>	95.1%	2.57%	2.31%
<u>S. aureus</u> + <u>E. coli</u>	94.8%	5.14%	0

TABLA IVa

RESULTADOS POR MES DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE E. COLI ATCC 25922 DE MARZO A JUNIO DE 1983.

ANTIBIOTICOS	M A R Z O			A B R I L			M A Y O			J U N I O		
	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.
AMPICILINA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CEFALOSPORINA	19.8	1.49	7.5	21.3	2.06	9.6	21.3	1.46	68	21.14	1.58	7.5
CARBENICILINA	25	2.38	9.5	27.4	5.24	19	25.3	1.6	6.3	28.1	1.58	5.6
TETRACICLINA	21.9	2.04	9.3	22.04	4.69	21.3	28.0	2.3	8.2	22.7	1.8	8.0
CLORANFENICOL	28.1	2.14	7.6	29.7	1.42	4.8	29.07	1.01	3.4	29.8	0.68	2.28
GENTAMICINA	29.0	1.89	6.5	27.8	5.27	18.9	30.1	1.05	3.5	28.6	1.44	5.06
FURADANTINA	27.9	2.8	10	26.7	3.18	11.9	24.8	1.95	7.9	24.5	1.9	7.7
TRIMETROPRIM	23.6	1.28	5.4	25.6	2.01	7.8	24.5	1.8	7.6	26.8	2.92	10.9

T A B L A V

X = Media aritmética

S = Desviación estandar

CV = Coeficiente de variación

RESULTADOS POR LOTE DE MULTIDISCOS DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE E. COLI ATCC 25922 DE MARZO A JUNIO DE 1983.

ANTIBIOTICOS	MARZO			ABRIL			MAYO			JUNIO		
	X	S	C.V.	Cambio de lote			Cambio de lote			Cambio de lote		
	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.
AMPICILINA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CEFALOSPORINA	19.8	1.49	7.5	17.5	2.06	11.7	17.5	1.5	9.4	20.6	1.54	7.6
CARBENICILINA	25	2.38	9.5	22.3	2.7	12.1	22.2	1.89	8.5	24.6	2.2	9.0
TETRACICLINA	21.9	2.04	9.3	19.7	1.9	9.8	19.0	2.0	10.7	19.3	3.96	20.2
CLORANFENICOL	28.1	2.14	7.6	20.3	4.7	23	21.7	4.4	20.6	29.06	1.76	6.05
GENTAMICINA	29.0	1.89	6.5	22.6	4.13	18.2	22.6	3.2	14.2	27.8	1.84	6.6
FURADANTINA	27.9	2.8	10	23.7	3.84	16.2	24.6	.84	34	26.8	2.47	5.6
TRIMETROPRIM	23.6	1.28	5.4	21.3	4.0	18.7	22	2.7	12.2	25.3	3.03	11.9

T A B L A Va

X = Media aritmética
 S = Desviación estandar
 CV = Coeficiente de variación

RESULTADOS POR MES DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE S.AUREUS ATCC 25923 DE MARZO A JUNIO DE 1983.

ANTIBIOTICOS	M A R Z O			A B R I L			M A Y O			J U N I O		
	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.
PENICILINA	31.4	2.6	8.3	30.8	2.13	6.9	31.4	2.24	7.15	30.1	1.88	6.2
AMPICILINA	24.7	1.6	6.5	25.7	2.2	8.5	25.9	2.14	8.2	20.7	3.7	18.1
CEFALOSPORINA	27.8	2.8	10.3	29	2.43	8.3	27.3	2.59	9.6	30.3	2.7	9.01
CLOXACILINA	20.2	2.4	11.9	14.6	3.18	21.7	26.4	2.26	8.5	R	R	R
ERITROMICINA	27.8	2.1	7.6	29.1	1.36	4.7	26.8	2.77	10.3	27.8	2.08	7.4
LINCOMICINA	15.92	2.1	13.2	14.9	1.74	11.6	27.1	3.08	11.3	14.33	1.39	9.6
TETRACICLINA	26.9	2.1	8.0	26.7	2.34	8.7	26.83	3.98	14.8	28.1	2.0	7.1
TRIMETOPRIM	11.5	1.97	17.17	*R	R	R	R	R	R	R	R	R

T A B L A VI

*R (resistente).

RESULTADOS POR LOTE DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE SAUREUS ATCC 25923 DE MARZO A JUNIO DE 1983.

ANTIBIOTICOS	M A R Z O			Abril (Cambio de lote)			M A Y O			J U N I O		
	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.
PENICILINA	31.4	2.6	8.3	27.2	2.9	10.7	26.3	6.3	24.1	26.9	4.42	16.4
AMPICILINA	24.7	1.6	6.5	21.8	3.8	17.5	17.6	4.8	23.2	17.6	4.27	24.1
CEFALOSPORINA	27.8	2.8	10.3	27.1	6.0	22.2	23.3	2.6	11.5	24	7.6	31.9
CLOXACILINA	20.2	2.4	11.9	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ERITROMICINA	27.8	2.1	7.6	26.2	2.8	10.9	24.8	5.7	23	25.2	2.9	11.7
LINCOMICINA	15.92	2.1	13.2	14.2	2.9	14.6	12.2	2.1	17.3	16.6	1.98	11.9
TETRACICLINA	26.9	2.1	8.0	20.4	1.84	9.0	21.3	2.2	10.4	21.9	3.04	13.9
TRIMETOPRIM	11.3	1.97	11.7	26	1.63	6.2	27.5	2.67	9.7	27.2	1.42	5.2

T A B L A VIa

* R (resistente)

RESULTADOS POR MES DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE P. AERUGINOSA ATCC 27853 DE MARZO A JUNIO DE 1983.

ANTIBIOTICOS	M A R Z O			A B R I L			M A Y O			J U N I O		
	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.
AMIKACINA	19.9	1.82	9.1	18.6	1.2	6.5	19.0	1.4	7.43	18.9	1.24	6.5
TOBRAMICINA	19.0	1.23	6.44	18.9	2.0	10.9	18.5	1.06	5.7	18.6	1.12	6.0
GENTAMICINA	18.8	0.69	3.6	18.7	0.72	3.8	18.4	3.8	20.6	18.5	1.1	5.9
CARBENICILINA	19.3	5.26	7.2	21.7	1.8	8.27	22.6	4.1	18.7	20.8	2.0	10

T A B L A VII

RESULTADOS POR LOTE DE LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD DE P. AERUGINOSA ATCC 27853 DE MARZO A JUNIO DE 1983.

ANTIBIOTICOS	M A R Z O			A B R I L			M A Y O			J U N I O		
	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.	X	S	C.V.
AMIKACINA	19.9	1.82	9.1	20.83	4.15	19.93	19.0	1.4	7.43	19.6	2.06	10.1
TOBRAMICINA	19.0	1.23	6.4	18.33	2.8	15.4	18.5	1.6	5.7	18.9	2.3	7.0
GENTAMICINA	18.8	0.69	3.6	15.1	3.96	25	15.6	4.6	12.6	18.0	3.2	12.1
CARBENICILINA	19.3	5.26	1.2	21	2.3	11.0	20.5	3.6	15.7	20.5	2.9	8.0

T A B L A VII a

RESULTADOS DE EFECTIVIDAD DE SUEROS ANTIESPECIE

MICROORGANISMO	RESULTADO *
15 Cepas de <u>Salmonella typhi</u>	No hubo aglutinación.
<u>Shigella flexneri</u>	No hubo aglutinación
<u>Shigella dysenteriae</u>	No hubo aglutinación
18 Cepas de <u>Shigella</u> sp.	No hubo aglutinación

* Todos los microorganismos fueron probados simultaneamente

TABLA IX

RESULTADOS DE EFECTIVIDAD DE DISCOS DE BACITRACINA Y OPTOQUINA

DISCO	RESULTADO
Bacitracina	Halo de inhibición con estreptococo Beta hemolítico grupo "A" *
Optoquina	Halo de inhibición con <u>Streptococcus pneumoniae</u>

* Los halos de inhibición fueron los esperados excepto cuando los discos estaban por caducar.

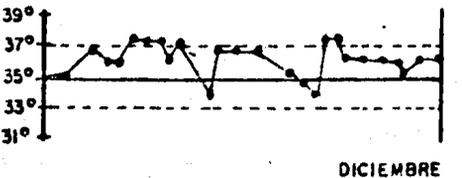
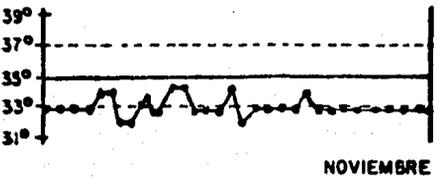
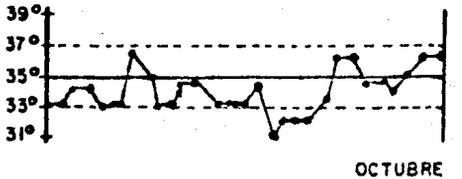
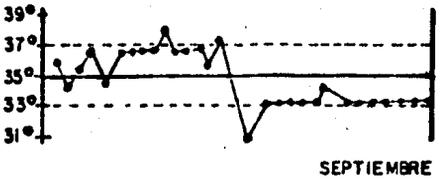
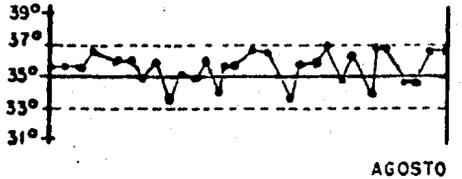
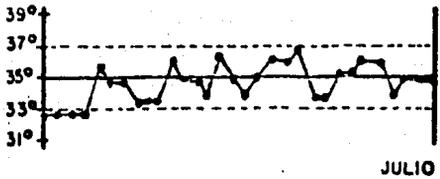
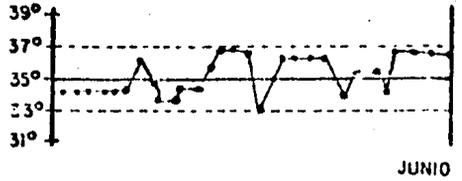
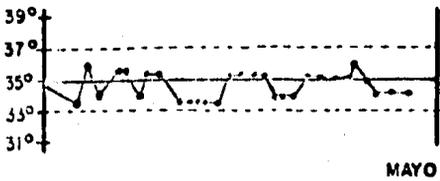
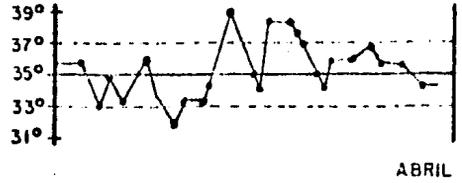
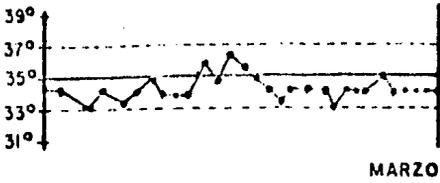
Los discos fueron probados al azar durante el uso de los mismos

TABLA IX

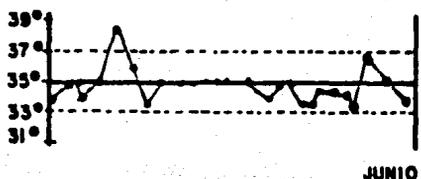
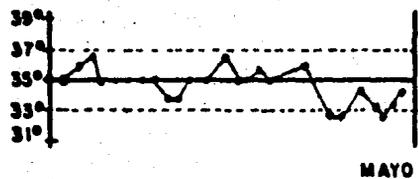
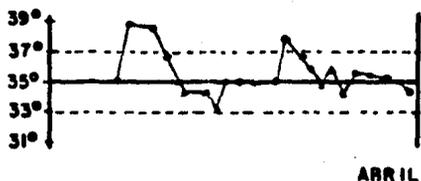
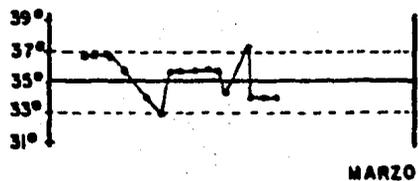
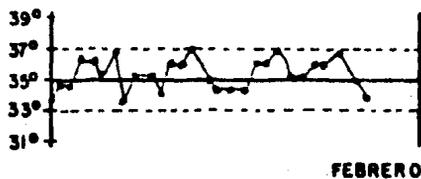
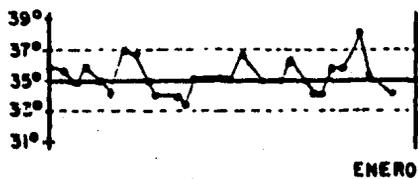
RESULTADOS DE BIOINDICADORES EN AUTOCLAVE

SUM	SEM	POSICION DE LOS BIOINDICADORES (ATTEST)	RESULTADOS Y OBSERVACIONES		
				tiempo: 20 min. temp. 121 °C	
E N E R O	1	1 en el fondo	Desarrollo negativo a las 24 hrs. de incubación		
		1 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
	2	2 en el fondo	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación		
		2 en la parte superior	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación		
3	2 en el fondo	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación			
	2 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
4	2 en el fondo		Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación		
	F E B R E R O	1	2 en el fondo		No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación
2		2 en el fondo		No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación	
3		2 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
		2 en la parte superior	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación		
4	1 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
	2 en la parte superior	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación			
M A R Z O	1	2 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
		2 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
	2	1 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
		2 en la parte superior	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación		
3	2 en el fondo		Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación (en los bioindicadores control hubo desarrollo)		
	4	2 en el fondo	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación		
1 en la parte superior		No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
A B R I L	1	2 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
		2 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
	2	2 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
		2 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
3	2 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
	2 en la parte superior	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación			
4	2 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
	2 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
M A Y O	1	1 en el fondo	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación		
		2 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
	2	2 en el fondo	Desarrollo positivo a las 24 hrs. de incubación		
		1 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
3	2 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
	1 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
4	1 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
	2 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación			
J U N I O	1	2 en el fondo	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
		2 en la parte superior	No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		
	2	2 en el fondo		No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación	
		3	2 en la parte superior		No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación
4	2 en el fondo		No hubo desarrollo a las 24 hrs. de incubación		

CUADRO DE GRAFICAS No. I
 REGISTRO DE TEMPERATURA (° Centigrados) DE LA INCUBADORA.
 DE MARZO A DICIEMBRE DE 1982.



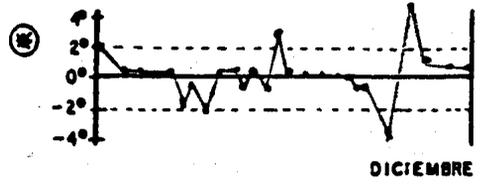
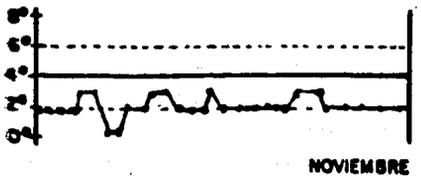
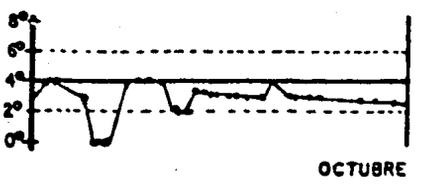
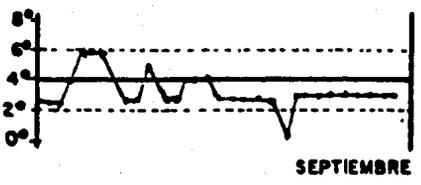
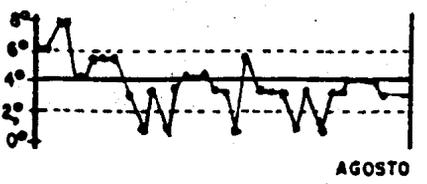
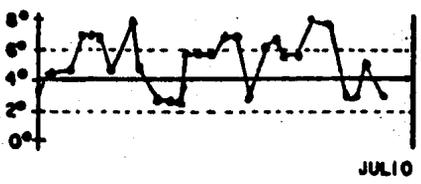
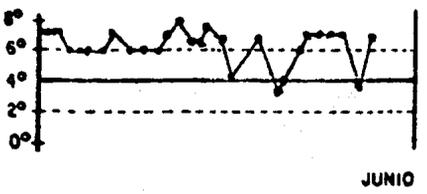
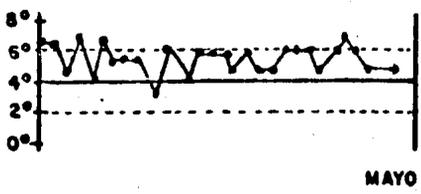
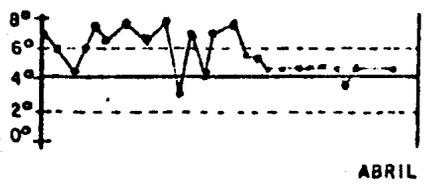
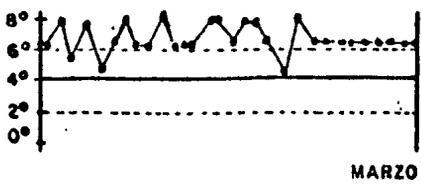
CUADRO DE GRAFICAS No. II
 REGISTRO DE TEMPERATURA (° Centígrados) DE LA INCUBADORA
 DE ENERO A JUNIO DE 1985.



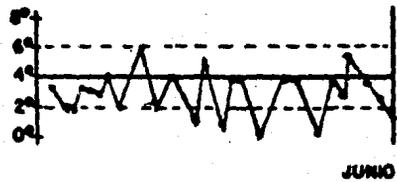
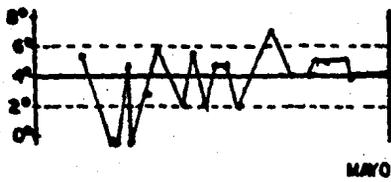
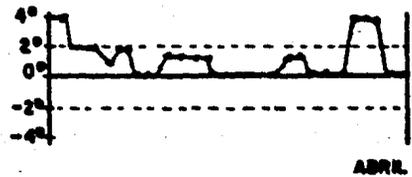
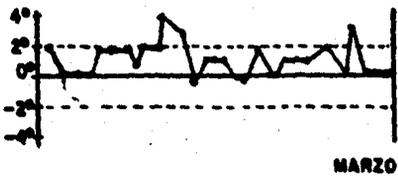
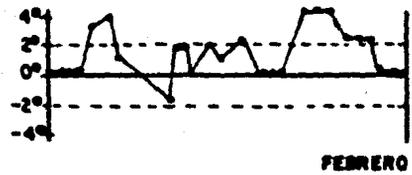
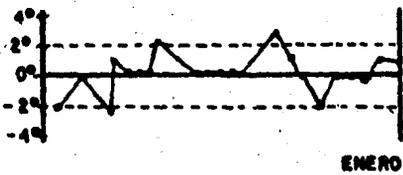
CUADRO DE GRAFICAS No. III
 REGISTRO DE TEMPERATURA (° Centigrados) DEL REFRIGERADOR
 DE MARZO A DICIEMBRE DE 1982.

(*)

LA MEDIDA SE CAMBIO A 0° CENTIGRADOS DEBIDO AL MAL
 FUNCIONAMIENTO DEL REFRIGERADOR.



CUADRO DE GRAFICAS IV
REGISTRO DE TEMPERATURA (° Centígrados) DEL REFRIGERADOR
DE ENERO A JUNIO DE 1983.



DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados correspondientes a las pruebas de esterilidad (Tabla I), muestran que algunos medios como el agar sangre Columbia, agar chocolate, agar Hektoen-enteric y agar Thayer Martin son los que con mayor frecuencia tuvieron contaminación.

En el caso del agar sangre Columbia, se llegó a comprobar que la sangre de carnero empleada estaba contaminada, notificándose al proveedor para que tomara las medidas necesarias para su corrección; con frecuencia el proceso de esterilización no fué satisfactorio, comprobándose esto por el desarrollo positivo de las esporas de B. stearothermophilus (Tabla VIII).

Uno de los primeros factores, que quizá es el que tiene mayor importancia, es el vaciado de la sangre al medio base y después a las caja Petri, ya que en esta etapa hay bastantes manipulaciones. En ocasiones las cajas Petri que se emplearon para el agar se encontraban en mal estado, sucias (polvo, cabellos) o deterioradas, lo que impedía utilizarlas. Sin embargo algunas veces estos detalles no son visibles y pueden pasar desapercibidos, lo que ocasiona una posible fuente de contaminación.

El agar chocolate y el agar Thayer Martin, son medios a los que se les adiciona suplementos estériles (polienriquecimiento e inhibidor VCN), quizá la contaminación se debió a una inadecuada reconstitución y conservación de estos suplementos, además de las otras fuentes de contaminación

mencionadas en el párrafo anterior. En estos medios se tenía poca experiencia en cuanto a su preparación, ya que con el tiempo el porcentaje de contaminación disminuyó considerablemente.

El agar Hektoen-enteric es un medio que señalan no necesita esterilización, pero la casa comercial no proporciona fecha de expiración a partir de su preparación, según la literatura (Tabla 3.1.3.) este tiempo es de un mes a partir de su preparación; sin embargo, el medio muestra contaminación a partir de los tres días de esta, encontrando que estaba formada por una mezcla de bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos y otras formas bacterianas de Gram variable, se notificó a la casa comercial.

En otros medios, como el agar triple azúcar hierro, agar lisina hierro y el citrato de Simmons, se presentó contaminación solo en una ocasión, fué del 100% pero se comprobó que el error había estado en el autoclave ya que después de que era utilizado varias veces en un día funcionaba incorrectamente y como estos medios eran los últimos en ser esterilizados, se provocó que el proceso fuera incompleto o no se había llevado a cabo en absoluto.

En medios adquiridos ya preparados comercialmente, como el medio de Lowenstein Jensen y las botellas para hemocultivo (Bioclin), tuvieron contaminación, notificándose al proveedor.

Pruebas de efectividad

La efectividad de la mayoría de los medios fué satisfactoria. (Tabla II). Excepto la de los medios Salmonella/Shigella, Hektoen-enteric, Thayer Martin y DNAasa, donde no se obtuvieron los resultados esperados. Los medios Hektoen-enteric y Salmonella-Shigella, permiten el desarrollo excesivo de microorganismos coliformes que deberían ser inhibidos; sin embargo, las reacciones de Salmonella typhi y Shigella sp. fueron las esperadas.

El medio de Thayer Martin permitió el desarrollo de microorganismos que deberían ser inhibidos por el VCN (vancomicina-colistin-nistatina), como los bacilos Gram negativos, cocos Gram positivos y levaduras, siendo sobre todo evidente el desarrollo de éstas últimas en muestras clínicas; no se contó con una cepa de Neisseria gonorrhoeae, para evaluar su desarrollo en este medio.

El medio de DNAasa no dió la reacción esperada con microorganismos que son DNAasa positivos como Serratia marcescens, aunque se siguieron fielmente las instrucciones de preparación y uso indicadas en el marbete del frasco, esto ha sucedido con varias personas que en diferentes sitios, han trabajado también esta prueba.

Los otros medios mostraron la reacción esperada con microorganismos

conocidos, el medio Mac Corkey solo tuvo problemas al principio - de su uso, debido a que estaban desarrollando cocos Gram positivos, - probablemente debido a la inadecuada preparación del mismo. Cuando se investigo la causa se encontró que el proceso de esterilización se había prolongado más del tiempo determinado (15 min a 121°C), esto ocasiono pérdida de la acción inhibitoria de los componentes del medio.

Registro de la temperatura del refrigerador e incubadora

Las gráficas muestran el comportamiento tanto del refrigerador como de la incubadora, es importante notar los puntos que salen del rango permitido, ya que, cuando se mantienen un tiempo prolongado a una temperatura inadecuada los reactivos, medios etc., se perjudica definitivamente el estado normal de los mismos y al utilizarse, ya no tendrán la actividad o las funciones para las que se usen. (Cuadro de gráficas I-IV).

Indol, catalasa, oxidasa, coagulasa

Las pruebas de indol y catalasa muestran que son pruebas confiables en un 100% ya que todas las veces que se realizaron nunca se obtuvieron - resultados falsos, ya sean positivos y/o negativos, se puede mencionar que los reactivos siempre fueron conservados en forma adecuada y tal vez sea este un factor importante para que las pruebas den la reacción correcta.

La prueba de oxidasa, aunque tuvo un porcentaje de 96.9 (Tabla IIIa) en positivos verdaderos y en falsos negativos 3.07%, se puede considerar como una prueba confiable, se puede señalar que los falsos negativos se debieron principalmente al estado del reactivo de oxidasa que en ocasiones era viejo o estaba precipitado. También se observó que la edad del cultivo influye en el resultado de la prueba, ya que aunque ésta sea positiva es muy débil cuando la cepa es vieja.

La prueba de la coagulasa es la que mostró el mayor porcentaje de falsos negativos (6.42%), probablemente se debió al origen del plasma, ya que provenía de la sección de Hematología, y muchas veces podía ser inadecuada, puesto que proviene de las pruebas de coagulación, en las que los pacientes muchas veces presentan trastornos. Algunas veces se presentó falso negativo en el control (Staphylococcus aureus ATCC 25923), mientras que al efectuar al mismo tiempo las coagulasas correspondientes al día de trabajo, estas dieron la prueba positiva. Cuando se investigó el porque la cepa tipo no estaba dando la prueba en forma correcta, se llegó a la conclusión de que la cepa de Staphylococcus aureus provenía de un cultivo viejo, porque el tener un cultivo reciente, el mismo plasma coaguló como era de esperarse.

Los resultados obtenidos de la tinción de Gram (Tabla IVa) muestran que hay un buen porcentaje que presenta la reacción esperada para los tres

grupos de microorganismos que se incluyen en la prueba, e indica que los reactivos empleados estaban en buenas condiciones, para los resultados encontrados en preparaciones que mostraron dos tipos de Gram y en los que la tinción fue lo contrario a lo esperado, se sabe que el error más frecuente es el humano, es decir que se realiza incorrectamente la tinción, por variaciones en el tiempo principalmente; sin embargo otro factor que también influye es el envejecimiento de las cepas utilizadas para el control.

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad (Tablas Va, VIIa) - muestran la media (\bar{X}), desviación estandar (S) y coeficiente de variación (C.V.) para cada cepa de referencia, se agruparon los datos por meses y cada que se realizaba cambio de lote de los discos. Se observó que había diferencias entre los resultados agrupados por lote y los del mes.

Un hecho que es importante mencionar es, que en el mismo lote de discos, al abrir un nuevo envase, los halos de inhibición cambian para algunos antibióticos, lo anterior puede indicar que no existe uniformidad en los lotes de multidiscos. También algunos de los discos como carbenicilina no cumplen con el contenido establecido por la FDA (Tabla 3.3.b), ya que el contenido del multidisco es de 50 microgramos, este es un hecho importante porque se alteran los halos de inhibición y se obtienen resultados incorrectos.

En lo que respecta a los sueros antiespecie para la tipificación de Salmonella y Shigella, se evaluaron con cepas de microorganismos conocidos, se contó con productos tanto de fabricación nacional como importados, los resultados muestran que nunca se obtuvieron las reacciones esperadas (aglutinación) con controles conocidos aún siguiendo perfectamente las instrucciones de reconstitución, almacenamiento y manejo de los sueros, así como del procedimiento para la tipificación.

El funcionamiento incorrecto del autoclave se comprobó por la presencia de desarrollo, en varias ocasiones, de las ampollitas de B. stearothermophilus; en algunos casos coincidieron estos resultados (Tablas VIII a XIII) con los altos porcentajes de contaminación al realizar las pruebas de esterilidad de los medios que se probaron en este trabajo.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Al realizar el control de calidad se encontró que los medios de cultivo, discos para pruebas de susceptibilidad y sueros antiespecie fabricados en nuestro país, desafortunadamente dejan mucho que desear, en especial los sueros antiespecie, aunque en estos últimos también hubo variabilidad de la calidad probablemente - debido al manejo (transporte, almacenamiento, etc.) de los mismos, por lo que cada laboratorio debería exigir, ya sea al fabricante o al proveedor, productos de óptima calidad.
- 2.- Los resultados de las pruebas de esterilidad mostraron que los medios que se contaminaron con mayor frecuencia fueron aquellos a los que se les adiciona suplementos estériles.
- 3.- Las pruebas de efectividad son imprescindibles, ya que están evaluando la calidad de los medios y reactivos empleados en el trabajo diario. Es importante notificar a la casa comercial en el caso dado de que el producto funcione mal.
- 4.- Aunque los resultados del control diario no revelaron variaciones importantes en las pruebas realizadas, se tienen que llevar cartas de registro, para que cuando se detecte un error, sea fácil investigar la causa.
- 5.- El control de las pruebas de susceptibilidad, uno de los procedimientos más importantes que ayudan al médico, debe realizarse día

- riamente para poder detectar cualquier anomalía que pudiese alterar los resultados clínicos.
- 6.- Siguiendo en forma adecuada el correcto funcionamiento del equipo como autoclave, refrigerador e incubadoras con sus respectivos controles y registros, se pueden detectar a tiempo fallas que pueden ocasionar trastornos en los procedimientos que se realizan en el trabajo diario.
 - 7.- El tener establecido un control de calidad en un laboratorio de Microbiología Clínica, da la seguridad de que los resultados obtenidos en el trabajo diario son confiables.
 - 8.- Los beneficios que obtiene el laboratorio realizando un control de calidad, se pueden resumir en la disminución de las quejas por parte de los médicos y el aumento de la confianza de éstos en los resultados que se reportan.
 - 9.- El programa de control de calidad debe implantarse en todos los laboratorios y seguirse ampliando y mejorando constantemente, aunque requiere de tiempo para abarcar satisfactoriamente todos los procedimientos que se realizan. Además se debe disponer de un presupuesto especialmente dedicado a control de calidad.

10.- Una vez que este funcionando el control de calidad en el laboratorio, sería conveniente que se participe en programas de control de calidad externos.

B I B L I O G R A F I A

- 1) Anderson, T.G., Standardized methods of antimicrobial susceptibility testing Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore, pag. 81, 1978.
- 2) Anhalt, J.P., Clinical Microbiology Quality Control, Laboratory Procedure Manual, Section of Microbiology, Mayo Clinic, Rochester Minnesota, 1979.
- 3) Bartlett, R.C., Can we afford the price of quality, Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore, pag. 1, 1978.
- 4) Bartlett, R.C., Functional Quality Control, Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore, pag. 145, 1978.
- 5) Bauer, A.W., Kirby, M., Sherris, J.C. and Turck, M., Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am.J.Clin. Pathol 45, 493, 1966.
- 6) Blazevic, D.J., Hall CH.T. and Wilson, M.E., Practical quality control procedures for the clinical Microbiology laboratory. Cumi-tech 3, Washinton, D.C., American Society for Microbiology, 1976.
- 7) Blazevic, D.J., Koepche, M.H. and Matsen, J.M., Quality control testing with the disk antibiotic susceptibility test of Bauer Kirby-Sherris-Turck. Am.J.Clin. Pathol 57, 592. 1974.

- 8) Blumerg, J.M., Laboratory safety. Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore, pag. 11, 1978.
- 9) Costin, I.D., Bioindicadores para el control de esterilización, - reimpresso de separata de Kontakte 2:74, 33, 1981.
- 10) Donovick, R., The role of American Type Culture Collection in - Microbiological quality control. Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore 1978, pag. 65.
- 11) Gavan, T.L., Microbiology; space, equipment, materials and techniques. En Tood, Sanfor, Davison (ed), Clinical Diagnosis and Management, by Laboratory, Vol. II 6a. ed. pag. 1553, 1981.
- 12) Gavan, T.L., Quality Control in Microbiology. En tood Sanford, Davison. (ed), Clinical Diagnosis and Management, by Laboratory, Vol. II 6a. ed. pag. 1939, 1981.
- 13) Glasser, L., Gail, M.D., and Boring, J.R. A sistematic program of quality control in Clinical Microbiology. Am.J.Clin. Pathol. 56, 379, 1971.
- 14) Grannis, G.F. Stathand, B.E. Monitoring the Quality of Laboratg ry Measurement. En Tood, Sanford, Davison. (ed), Clinical Diagnosis and Management, by Laboratory, Vol. II 6a. ed. pag 1981.
- 15) Kereluk, K. Quality control in sterilization procedures: biological indicators. Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore, pag. 25, 1978.

- 16) LaMotte, L.C. The role of center for disease control in external proficiency testing. *Quality Control in Microbiology*, University Park Press, Baltimore, pag. 137, 1978.
- 17) Laskaris, P.D., Chaney, A.L. Reliability of biological autoclave sterilization indicators. *Am.J.Clin. Pathol.* 52, 495, 1969.
- 18) Levey, S., and Jennings, E.R. The use of control charts in the clinical laboratory. *Am.J.Clin. Pathol* 20, 1059, 1960.
- 19) Mac Fadden, J.F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, pag. 50, 19.
- 20) Morton, H.E. Maintenance and use of stock cultures in Microbiological Quality Control. *Quality control in Microbiology*, University Park Press, Baltimore, pag. 55, 1978.
- 21) Murali, M.S. Total Quality Control in the Clinical Laboratory. South Side Hospital, Pittsburgh, Pennsylvania. The C.V. Mosby Company. Sant Louis. 1977.
- 22) Pickardo, R.A. Pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. *Infectología*. Vol. II, pag. 215, 1982.
- 23) Power, D.A. Quality control of commercially prepared bacteriological media. *Quality Control in Microbiology*. University Park - Press, Baltimore, pag. 47, 1978.
- 24) Prier, J.E. The role of state public Health laboratory in external quality control. *Quality Control in Microbiology*, University Park Press, Baltimore, pag. 123, 1978.

- 25) Rusell, J.E. Total quality control for the Medical Laboratory. Am.J.Clin.Pathol 54, 435, 1970.
- 26) Rusell, R.L., and Yoshimuri, R.S. A quality control program for Clinical Microbiology. Am. J.Clin. Pathol 52, 489, 1969.
- 27) Rusell, R.L. Quality control in Microbiology laboratory. En Lennete, Spaulding, Truant. (ed). Manual of Clinical Microbiology 2a. ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 862, 1974.
- 28) Suggs, M.T. Product class (specifications) and evaluation of microbiological in vitro diagnostic reagents. Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore, pag. 87, 1978.
- 29) Vera, H.D. Control de calidad en Microbiología Diagnóstica. - Reimpresión de Health Laboratory Science Vol. 8, No. 3 1971.
- 30) Vera H.D., and Dumoff, M. Culture media. En Lennete, Spaulding, Truant. (ed). Manual of Clinical Microbiology. 2a. ed. American - Society for Microbiology, Washington, D.C. 881, 1974.
- 31) Wilson, M.E. Microbiological proficiency: what basis for confidence. Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore, pag. 119, 1978.
- 32) Wrigh, W.W. Quality control of antibiotic susceptibility disks. Quality Control in Microbiology, University Park Press, Baltimore pag. 69, 1978.