



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ASEGURAMIENTO DE CALIDAD EN
ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS"

TRABAJO ESCRITO VIA CURSOS
DE EDUCACIÓN CONTINUA
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
LEONARDO BENJAMIN CORONA HERNÁNDEZ



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA 2005

m 340260



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).

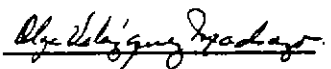
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Olga Velázquez Madrazo
Vocal	Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López
Secretario	Prof. María del Rocío Cassaigne Hernández
1er. Suplente	Prof. Karla Mercedes Díaz Gutiérrez
2do. Suplente	Prof. Zoila Nieto Villalobos

Sitio Donde se desarrolló el tema:

Fundación Roberto Medellín y Bibliotecas de la UNAM.



Q.F.B. OLGA VELÁZQUEZ MADRAZO

Asesor del tema



LEONARDO BENJAMÍN CORONA HERNÁNDEZ

Sustentante

Autoriza a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a editar en formato digital e imprimir el contenido de mi trabajo excepcional.

NOMBRE Leonardo Benavides
Corzo UN HUANUQUE

FECHA: 24/1/05

SUBSCRIBO: Lda. C. H.

A todas las personas que forman parte de mi vida

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo	
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Desarrollo histórico	
2.2. Evolución del control de calidad en México	
2.3. Principales definiciones de calidad	
2.4. Sistemas de gestión de calidad	
2.5. Los pilares para asegurar la calidad	
3. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD	8
3.1. Lineamientos generales para el aseguramiento de la calidad	
3.2. Control de calidad interno y externo	
3.3. Factores involucrados en el aseguramiento de la calidad	
3.3.1. Factores involucrados en el aseguramiento de la calidad y su asociación con la NMX-CC-9001-IMNC-2000	
3.3.2. Control de muestras	
3.3.3. Personal	
3.3.4. Servicios y áreas de trabajo	
3.3.5. Equipos e instrumentos	
3.3.6. Reactivos	
3.3.7. Procedimientos operacionales estándar (POE)	
3.3.8. Métodos	
3.3.9. Material de referencia	
3.3.10. Auditorías	
4. ENSAYOS BACTERIOLÓGICOS	22
4.1. Elección de sistema de prueba	
4.2. Mutagenicidad y carcinogenicidad	
4.3. Pruebas de mutagenicidad con <i>Salmonella</i>	
4.4. Cultivo y preparación de cepas bacterianas	
4.5. Confirmación de genotipo de las cepas bacterianas	
4.6. Disposición de residuos	
4.7. Precauciones de seguridad	
4.8. Puntos críticos de control	
5. DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA	34

1. INTRODUCCIÓN

Entre los métodos de prueba de laboratorio que son empleados de manera común se encuentran los ensayos bacterianos, dado que poseen una serie de cualidades que los hacen de gran utilidad en la evaluación de compuestos que de otra manera no podrían analizarse como por ejemplo en pruebas de toxicidad, genotoxicidad ó mutagenicidad, (aunque existen otros sistemas biológicos que pueden emplearse), ó cuando se requiere el ensayo de gran número de muestras o resultados en tiempos relativamente cortos, los sistemas bacterianos son una buena elección, ya que, en términos generales, son fáciles de realizar, económicos, de corta duración, versátiles, adaptables, requieren de materiales de fácil adquisición, dan información cualitativa y/o cuantitativa, entre otros.

En el caso particular de los ensayos de mutagenicidad, los sistemas bacterianos son una buena alternativa ya que permiten determinar la inducción de cambios génicos, además de que proveen indicios de los mecanismos a través de los cuales se producen las mutaciones por lo que dan información sobre la capacidad mutagénica de los compuestos

La información generada por los ensayos con bacterias puede ser empleada en la caracterización de compuestos o zonas de riesgo potencial para la salud humana; sin embargo la importancia sanitaria y utilidad de los datos generados por los ensayos microbiológicos dependerá en gran medida de la confiabilidad de los mismos. De aquí la necesidad de contar con sistemas eficientes que aseguren la veracidad, confianza y oportunidad de su emisión. Esto se puede lograr a través de los denominados sistemas de gestión de calidad que, cuando son llevados a cabo bajo condiciones óptimas, aseguran la confiabilidad de los datos generados.

Una de las herramientas con que se cuenta para proteger la validez científica son los sistemas de aseguramiento de la calidad, que no es otra cosa que un modo ordenado de realizar las prácticas necesarias para eliminar o reducir los errores en cualquier operación aplicada en el laboratorio y que pueden ser atribuibles al personal, equipo, suministros, procedimientos de muestreo, y métodos analíticos.

Una aplicación práctica del empleo de los ensayos bacterianos se da en la caracterización mutagénica de las aguas generadas en la Ciudad de México dado que, la producción masiva de diversas sustancias, ha propiciado que las poblaciones se encuentren cada vez más expuestas a ellas. Aunque es evidente que los productos químicos participan activamente en el mejoramiento de las condiciones de vida de la población; también se han puesto de manifiesto algunos efectos dañinos de estos productos sobre la salud humana, así como de los demás organismos que conforman al ambiente.

Los contaminantes ambientales pueden llegar al ser humano de distintas formas. Una de ellas es a través de la contaminación de los mantos acuíferos debido a la precipitación de partículas desde el aire y a su posterior infiltración al subsuelo; otra es la filtración de lixiviados de basureros o a la contaminación por fugas de drenaje doméstico e industriales. De esta manera los contaminantes llegan al ser humano mediante el agua de consumo.

Existen otras rutas por las cuales los contaminantes del agua pueden llegar al humano y representar un riesgo a la salud. Todas ellas se relacionan con la ingestión de productos que fueron cultivados con aguas contaminadas (aguas residuales o tratadas) o de alguna manera dentro de una cadena se ven relacionados con este tipo de agua.

Cualquiera que sea la ruta por la cual los contaminantes llegan al ser humano, el hecho es que los efectos adversos a la salud son evidentes por lo que la evaluación del riesgo y la vigilancia de la calidad del agua de consumo se han convertido en prioritaria, sin descuidar por supuesto las demás rutas de acceso de los contaminantes.

El daño inducido por algunos compuestos químicos que contaminan al agua (algunos incluso propiciados por los mismos métodos de tratamiento), puede afectar al material genético a través de la mutagénesis, que es uno de los riesgos toxicológicos potenciales que es necesario evaluar en los sistemas de tratamiento y suministro de agua, ya que existen evidencias de una relación de causa-efecto entre la mutagénesis y la carcinogénesis así como entre mutagénesis y teratogénesis. (ciertas alteraciones del desarrollo)

En México, las estadísticas del sector salud indican que entre las primeras causa de muerte antes del primer año de vida, se encuentran las malformaciones congénitas; así mismo, señalan que después de los 45 años de edad los padecimientos degenerativos (cáncer) constituyen también una de las más importantes causas de muerte. Por ello y ante la creciente contaminación del ambiente -y por consiguiente del agua- tanto en zonas urbanas como rurales, es necesario desarrollar acciones tendientes a identificar los agentes ambientales que constituyen un riesgo para la salud.

En virtud de lo anterior, las pruebas para detectar mutágenos son consideradas en la actualidad como una de las herramientas más útiles en el monitoreo de carcinógenos ambientales, además de que tienen también un gran valor en la evaluación de agentes que pueden constituir un riesgo para la reproducción en la población, ya que se considera que las mutaciones pueden causar un incremento en la incidencia de esterilidad, abortos, muertes perinatales y padecimientos hereditarios.

De ahí que el monitoreo de mutágenos en agua potable y tratada, mediante técnicas bacterianas sea una herramienta adecuada para evaluar un riesgo; también

puede emplearse como criterio para determinar el sitio donde deberá realizarse un análisis químico preciso para identificar los agentes potencialmente tóxicos y sus posibles fuentes emisoras.

Dentro del alcance del presente trabajo se describirán algunos de los aspectos relevantes en la planeación del aseguramiento de la calidad en un ensayo microbiológico, para generar resultados que posean la validez científica requerida para su utilización; la propuesta será ilustrada con el caso particular del ensayo de AMES.

1.1 Objetivo

El objetivo del presente trabajo es analizar los lineamientos generales de ISO 9001-2000 (Correspondiente a la NMX-CC-9001-IMNC-2000) para aplicarlos al "Aseguramiento de Calidad en ensayos Microbiológicos" en particular al ensayo de AMES para detección de mutágenos en agua.

2. ANTECEDENTES

El concepto de calidad así como los sistemas desarrollados para su implementación como los conocemos hoy día, han venido evolucionando desde el siglo antepasado y siguen en constante proceso de cambio. Las mayores influencias en la evolución del control de calidad, fueron dadas por la revolución industrial, primera y segunda guerra mundial, el desarrollo de la comunicación y transporte, la globalización de la economía lo que dio lugar a la necesidad de intercambiar materias primas, lo que a su vez dio pie al desarrollo de normas y certificaciones de carácter internacional.

2.1 Desarrollo histórico de conceptos y sistemas de calidad

Hacia 1888	El operador hace todo el trabajo de fabricación del producto y se hace responsable de la calidad de su trabajo y por tanto del producto.
1900-1918	Surge la división del trabajo en equipo, se forman grupos de operarios y cada grupo hace una etapa más o menos limitada de la producción. En el periodo de la primera guerra mundial surge el capataz quien se responsabiliza de que los operarios trabajen y hagan las cosas "bien". El capataz es responsable de la calidad y cantidad de trabajo.
1918-1937	La cantidad de fabricación aumenta y el sistema de producción se vuelve más complejo, cada capataz tiene que vigilar mucha gente. Surge la necesidad de separar el trabajo de vigilar la cantidad y el cuidar la calidad del resultado del trabajo, dando nacimiento a los inspectores, de tiempo completo, de calidad de producto.
1937-1960	La segunda guerra mundial obliga al crecimiento de la producción en masa y surge la aplicación de la estadística para el control estadístico de calidad. Se desarrolla la inspección por lotes en lugar de la inspección al 100%. El control de calidad es restringido solamente a algunas áreas (generalmente áreas de producción).
1960- a la fecha	Con el desarrollo de comunicaciones y transportes aumenta la competencia, el mercado se vuelve cada vez más de compradores que de fabricantes y las industrias se ven obligadas a producir producto de calidad al menor costo, lo que lleva a la necesidad de establecer el concepto de control total de la calidad; en este enfoque de control de calidad el personal que ejecuta cada etapa del proceso es el responsable del mismo y no los inspectores al final del proceso. Además de las técnicas estadísticas de control de calidad, en este enfoque se emplean otras, como la motivación para la obtención de calidad.

Actualmente la calidad forma parte de la estrategia administrativa de las empresas de todo tipo a fin de mantener la competitividad. La calidad total incluye los procesos de producción así como los administrativos. El enfoque va hacia la calidad de las cadenas productivas en conjunto, en vez de optimizar los eslabones por separado.

2.2 Evolución del control de calidad en México

- 1900-1950 Control de calidad basado en inspección. Se establecen las primeras normas industriales.
- 1950-1984 Surge el profesionalismo de la calidad: En 1950 se funda la Asociación Nacional Mexicana de Control de Calidad. (ANMCC) En 1973 se funda el Instituto Mexicano de Control de Calidad (IMECCA), se inicia el entrenamiento para especialistas en calidad. Se ensayan los primeros intentos de círculos de calidad. Varias compañías se vuelven pioneras en actividades de control total de calidad.
- 1984-1987 Administración moderna de calidad. Control estadístico del proceso. Se inicia el intercambio con la Japanese Union of Scientist and Engineers (JUSE).
- 1987-1990 Acelerado crecimiento en administración total de calidad. Se instituye el premio nacional de calidad Se forman asociaciones que fomentan la calidad. Muchas compañías inician campañas de control total de la calidad.
- 1990-1994 Inicio de certificación en normas internacionales como las normas ISO. Varias compañías certifican su sistema de calidad en la norma ISO 9000. Se establecen los primeros organismos certificadores. En 1993 se crea el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (IMNC).

El avance en la filosofía y sistemas de calidad se debe a algunos de los grandes "gurus" de la calidad, cuyo aporte cronológico se describe brevemente a continuación.

- | | | |
|------|-----------------|--|
| 1920 | Walter Shewhart | Padre de los sistemas de calidad. Empleo de gráficas de control. |
| 1946 | Edwards Deming | Control estadístico de calidad. La administración es la responsable del 85% de los problemas de calidad. |
| 1950 | Kaoru Ishikawa | Empleo de las 7 herramientas básicas (herramientas estadísticas), creador de los círculos de calidad. |

1954	Joseph M. Juran	Trilogía de la calidad (Planeación, control y mejora).
1960	William E. Conway	Inspección. Estadística de datos.
1975	Philip B. Crosby	Calidad como cumplimiento de requisitos, cero defectos, costo de calidad.
1988	Armand Feingenbaum	Creador del control total de la calidad.
1992	Masaaki Imai	Calidad total y mejora continua (KAIZEN).

A la fecha se cuenta con más de un centenar de herramientas para la gestión de la calidad

2.3 Principales definiciones de calidad

La definición de calidad al igual que sus concepciones han cambiado en el transcurso del tiempo, algunas de ellas se listan a continuación:

- a) Calidad es el cumplimiento de requisitos.
- b) La calidad se define como el cumplimiento de las expectativas del cliente.
- c) La calidad es la adecuación al uso.
- d) La calidad es la resultante de las características del producto y de los servicios de mercadotecnia, producción, mantenimiento y de servicio al cliente, con lo que se satisfacen los requisitos o las expectativas del cliente.
- e) La calidad es la resultante de las características del producto y de los servicios de mercadotecnia, producción, mantenimiento y de servicio al cliente, con lo que se satisfacen los requisitos o las expectativas del cliente.
- f) La calidad la juzga el cliente.

Para fines de la normatividad Mexicana **NMX-CC-001:1995 IMNC/ISO 8402:1994** Administración de la calidad y aseguramiento de la calidad – Vocabulario. La calidad se define como:

El conjunto de características de un elemento que le confiere la aptitud para satisfacer necesidades explícitas e implícitas.

Esta definición parece tan buena como cualquiera de sus antecesoras ya que cubre el requisito final de la satisfacción del cliente: sin embargo, y al igual que las demás

definiciones, carecen de un componente de vital importancia que es la satisfacción del cliente " al menor costo".

2.4 Sistema de Gestión de Calidad

La adopción de un sistema de gestión de la calidad debería ser una decisión estratégica de la organización. El diseño y la implementación del sistema de gestión de la calidad de una organización está influenciado por diferentes necesidades, objetivos particulares, los productos suministrados, los procesos empleados y el tamaño y estructura de la organización

Principios de la gestión de calidad:

1. Enfoque al cliente
2. Liderazgo
3. Participación del personal
4. Enfoque de procesos
5. Gestión basada en sistemas
6. Mejora continua
7. Toma de decisiones basadas en hechos
8. Relación mutuamente beneficiosa con el proveedor

Norma ISO 9001:2000 (NMX-CC-9001-IMNC-2000)

La norma mexicana promueve la adopción de un enfoque basado en procesos cuando se desarrolla, implementa y mejora la eficacia de un sistema de gestión de la calidad para aumentar la satisfacción del cliente mediante el cumplimiento de sus requisitos. Dentro del modelo de un sistema de gestión de la calidad se contemplan los siguientes aspectos:

- Responsabilidades de la dirección
- Gestión de los recursos
- Realización del producto
- Medición, análisis y mejora
- Mejora continua del sistema de gestión de la calidad

2.5 Los pilares para asegurar la calidad

El primero en emplear el concepto de aseguramiento de calidad se atribuye a Philip B. Crosby, que definía el significado de aseguramiento de calidad como "Hacer que la gente haga mejor todas las cosas importantes que de cualquier forma tiene que hacer". Para ello Crosby consideraba cuatro pilares fundamentales, contruidos de tal manera que se complementan mutuamente y que eran:

Actitud y participación de la dirección.- La dirección tiene que comprometerse y tomar acciones cuando se trata de calidad.

Administración profesional de la calidad.- Se requiere de personal altamente calificado que entienda todos los aspectos involucrados con la administración de la calidad.

Programas originales.- El fundamento de los programas de calidad es un proceso de mejoramiento de la calidad a través de la prevención de defectos, el cual consiste de catorce pasos.

Reconocimiento.- Crosby consideraba de vital importancia dar reconocimiento a aquellas personas que ofrecieran un apoyo destacado al programa de calidad.

Si bien los principios básicos descritos por Crosby siguen siendo fundamentales, la evolución de conceptos y métodos de control, como se mencionó, han aportado mayor cantidad de herramientas que, si son empleadas de manera adecuada, garantizan el "Aseguramiento de la calidad".

3. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

3.1 Lineamientos generales para el aseguramiento de la calidad

En cualquier entidad, un programa de aseguramiento de la calidad debe ser práctico, integrador y requerir de relativamente poco tiempo para su ejecución a fin de no interferir con las funciones primarias en el caso de un laboratorio, que cuando sea aplicado apropiada y conscientemente debe asegurar la producción de datos de elevada reproducibilidad y confiabilidad.

La planeación del aseguramiento de la calidad establece una serie de principios operativos que en su conjunto constituyen el programa de aseguramiento de la calidad. La preparación del plan de aseguramiento de la calidad incluye lo siguiente: un documento oficial aprobado, la participación del personal de la organización y la

2.5 Los pilares para asegurar la calidad

El primero en emplear el concepto de aseguramiento de calidad se atribuye a Philip B. Crosby, que definía el significado de aseguramiento de calidad como "Hacer que la gente haga mejor todas las cosas importantes que de cualquier forma tiene que hacer". Para ello Crosby consideraba cuatro pilares fundamentales, construidos de tal manera que se complementan mutuamente y que eran:

Actitud y participación de la dirección.- La dirección tiene que comprometerse y tomar acciones cuando se trata de calidad.

Administración profesional de la calidad.- Se requiere de personal altamente calificado que entienda todos los aspectos involucrados con la administración de la calidad.

Programas originales.- El fundamento de los programas de calidad es un proceso de mejoramiento de la calidad a través de la prevención de defectos, el cual consiste de catorce pasos.

Reconocimiento.- Crosby consideraba de vital importancia dar reconocimiento a aquellas personas que ofrecieran un apoyo destacado al programa de calidad.

Si bien los principios básicos descritos por Crosby siguen siendo fundamentales, la evolución de conceptos y métodos de control, como se mencionó, han aportado mayor cantidad de herramientas que, si son empleadas de manera adecuada, garantizan el "Aseguramiento de la calidad".

3. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

3.1 Lineamientos generales para el aseguramiento de la calidad

En cualquier entidad, un programa de aseguramiento de la calidad debe ser práctico, integrador y requerir de relativamente poco tiempo para su ejecución a fin de no interferir con las funciones primarias en el caso de un laboratorio, que cuando sea aplicado apropiada y conscientemente debe asegurar la producción de datos de elevada reproducibilidad y confiabilidad.

La planeación del aseguramiento de la calidad establece una serie de principios operativos que en su conjunto constituyen el programa de aseguramiento de la calidad. La preparación del plan de aseguramiento de la calidad incluye lo siguiente: un documento oficial aprobado, la participación del personal de la organización y la

definición de sus responsabilidades, control de muestras y procedimientos documentados, procedimientos estandarizados de operación para cada método analítico, perfil de capacitación de los analistas, procedimientos de mantenimiento preventivo de los equipos, procedimientos de calibración, acciones correctivas, acciones de control de calidad interna, diseño de auditorías, evaluación de procedimientos, validaciones y reportes.

El documento oficial aprobado debe ser indicativo de que el plan ha sido revisado y se le ha juzgado apropiado para la organización, indicando las responsabilidades de los distintos integrantes de la cadena de mando así como la asignación de funciones específicas de cada persona involucrada.

El control de muestras y los procedimientos documentados permiten el trazamiento de una muestra es decir su seguimiento desde su colecta hasta el reporte de resultados. La documentación siempre es importante pero especialmente cuando los requerimientos de la cadena de custodia son requisitos legales.

Un procedimiento operativo estandarizado debe describir con suficiente detalle un método, de tal modo que un analista experimentado no familiarizado con el mismo pueda obtener resultados aceptables. Los perfiles de capacitación deben ser especificados. El número de análisis requeridos y la incertidumbre de los resultados puede variar con el tipo de análisis, características de la muestra, y la experiencia del analista.

Los procedimientos de mantenimiento preventivo de los equipos son un requisito. Un estricto programa de mantenimiento preventivo evita malfuncionamientos y desajustes, además de la reducción en la pérdida de tiempo.

Las inspecciones de aseguramiento de calidad contemplan comúnmente las inspecciones relativas a las instalaciones abarcando la infraestructura en general y las actividades en el laboratorio entre las que se encuentran: instalaciones, servicios de apoyo, sistemas de información, capacitación, vigilancia ambiental, mantenimiento, calibración, etc. O las inspecciones relativas a los procedimientos, destinadas a verificar procedimientos o métodos y por lo general se efectúan aleatoriamente.

El adecuado registro y manejo de los datos, la validación y los reportes son una de las características finales en un programa de aseguramiento de la calidad. Las lecturas obtenidas de un instrumento analítico deben ser ajustadas para aquellos factores como la eficiencia del instrumento, eficiencia de extracción, tamaño de la muestra, y valores históricos, antes de que dichos resultados puedan ser de utilidad. El plan de aseguramiento de la calidad debe especificar los factores de corrección que serán aplicables así como los pasos a seguir en la validación de resultados. El reporte de resultados deberá ser adecuado a unidades estándar de masa, volumen o concentración.

3.2 Control de calidad interno y externo

Todos los laboratorios poseen prácticas de control interno involucrando el sentido común. Sin embargo un buen programa de control de calidad interno, debe asegurar la operación correcta de todos los factores incluyendo las técnicas de muestreo, almacenamiento, servicios, personal, equipo, suministros, medios, y procedimientos analíticos de prueba. Para lograr esto, puede apoyarse en elementos como son: certificación de la competencia del operador, análisis de estándares de origen externo, análisis de blancos, calibración con estándares, análisis de duplicados, y mantenimiento de cartas de control.

En el control de calidad externo se pueden emplear muestras de comparación con otros laboratorios, evaluación de muestras proporcionadas por agencias certificadas o muestras ciegas preparadas por laboratorios ajenos, así como auditorías externas a fin de detectar cualquier variación de los procedimientos estandarizados y en caso de ser necesario tomar medidas correctivas.

3.3 Factores involucrados en el aseguramiento de la calidad

A continuación se da una breve guía de los factores a considerar en la elaboración de los programas de control de aseguramiento de la calidad.

1. Muestreo

- a) Toma de muestras
- b) Transporte de muestras
- c) Procedimientos en el manejo de las muestras
- d) Cadena de custodia

2. Servicios

- a) Sistema de aire
- b) Áreas de trabajo
- c) Tráfico
- d) Paredes y pisos
- e) Monitoreo de limpieza en las áreas
- f) Sistemas de desinfección
- g) Hacinamiento
- h) Iluminación

3. Personal

- a) Educación
- b) Formación
- c) Habilidades
- d) Experiencia apropiada

4. Equipo e instrumental

- a) Termómetros
- b) Balanzas
- c) Medidores de pH
- d) Conductímetro
- e) Centrifugas
- f) Unidades de desionización de agua
- g) Destilador de agua
- h) Aparatos dispensadores
- i) Hornos
- j) Autoclaves
- k) Refrigeradores
- l) Congeladores
- m) Equipos de filtro de membrana
- n) Lámparas de luz ultravioleta
- o) Campanas de flujo laminar
- p) Baños de agua
- q) Incubadoras
- r) Microscopios
- s) Etc.

5. Suplementos y reactivos

- a) Cristalería
- b) Utensilios y contenedores para la preparación de medios
- c) Agua purificada
- d) Medios
- e) Membranas
- f) Reactivos
- g) Colorantes
- h) Filtros de membrana
- i) Medios de cultivo
- j) Material de referencia
- k) Animales de laboratorio
- l) Cepas bacterianas

6. Procedimientos y Métodos

7. Auditorías

Cabe mencionar que existen problemas especiales en el caso de los ensayos microbiológicos debido a que estándares analíticos, muestras enriquecidas y muestras de referencia, generalmente no existen en el mercado. En el caso particular de las cepas bacterianas empleadas en el ensayo de AMES existen cepas certificadas en el mercado. Pero es muy importante conservarlas y controlarlas adecuadamente.

3.3.1 Factores involucrados en el aseguramiento de la calidad y su asociación con la norma (NMX-CC-9001-IMNC-2000)

A continuación se describen con mayor detalle las características a considerar en los programas de aseguramiento de la calidad. Además se incluyen de manera genérica los apartados e incisos a que hace referencia la normatividad, basándose en la ISO 9001-2000. (NMX-CC-9001-IMNC-2000)

3.3.2 Control de muestras (7.5.3 identificación y trazabilidad)

El objetivo es establecer un sistema que garantice las actividades de muestreo, recepción, conservación, distribución, seguimiento y elaboración del informe final mediante procedimientos operacionales estándares (POE) de las muestras. Debe especificarse una persona responsable de la organización y ejecución de este trabajo.

- 1) **Toma de muestras:** Los procedimientos y métodos de muestreo deben estar descritos mediante Procedimientos Operacionales Estándares específicos.
- 2) **Recepción de muestras:** Las muestras deben ser recibidas en el área destinada a tal fin y deben venir acompañadas de un solicitud de ensayos en la cual deben aparecer los siguientes datos:
 - fecha
 - hora
 - folio
 - sitio de monitoreo
 - temperatura

- nombre del muestreador
- volumen de la muestra
- tipo de análisis
- observaciones

3) **Registro de las muestras:** Se reflejarán los datos correspondientes a las muestras en un registro, después de realizar una inspección visual de las mismas, comprobando que la información esté en conformidad con los datos de la solicitud entregada, que no haya signos de deterioro, así como la temperatura de conservación con que se recibió.

4) **Distribución:** Las muestras se distribuirán a las distintas áreas de acuerdo con los análisis a realizar. Cada área a su vez recibirá las mismas y llevará un registro de recepción para su control.

3) **Informes finales:** Se debe establecer un sistema de seguimiento de las muestras y de las pruebas que permita consolidar los resultados y emitir el resultado final. Estas operaciones deben estar avaladas a través de POE.

3.3.3 Personal (6.2 Recursos humanos. 6.2.2 Competencia, toma de conciencia y formación)

Se debe contar con el personal necesario en número y con las calificaciones para ejecutar las funciones y responsabilidades correspondientes. Cabe mencionar que todo el personal involucrado debe mantener confidencialidad de la información y resultados.

Dentro de la estructura de personal se identifican:

- a) Director
- b) Jefe del laboratorio
- c) Jefe de área
- d) Profesionales, técnicos y auxiliares de laboratorio
- e) Personal de apoyo administrativo, mantenimiento, limpieza y servicios

Cada puesto de trabajo debe tener una descripción del cargo en la que se incluya: nombre de puesto, funciones y responsabilidades, formación académica exigida y/o perfil de capacitación, y experiencia.

3.3.4 Servicios y áreas de trabajo (6.1 Provisión de recursos. 6.3 Infraestructura. 6.4 Ambiente de trabajo)

Se debe contar con un mínimo de requerimientos técnicos de las áreas del laboratorio de tal modo que se facilite el flujo de personal, equipos, materiales, muestras, reactivos, desechos y otros medios necesarios para el desarrollo del trabajo.

La máxima dirección será la responsable de garantizar la implementación de las condiciones descritas y el jefe de área será el responsable de que se mantengan las condiciones implementadas.

Características generales que deben cumplir las áreas.

- a) El diseño debe tomar en cuenta los requerimientos técnicos que faciliten un adecuado flujo de personal, materiales, equipos, muestras, otros medios necesarios para el trabajo y desechos, debiendo responder a las exigencias mínimas de seguridad que faciliten el manejo de sustancias potencialmente peligrosas y el uso apropiado de animales de laboratorio, cuando se requiera, así como la evacuación del personal en caso necesario.
- b) La iluminación y ventilación deben corresponderse a las exigencias de cada área de trabajo, según los requerimientos específicos de la actividad que se realice. Las superficies de las mesas de trabajo deben ser lisas, de fácil limpieza y de material resistente al ataque de sustancias químicas.
- c) Las instalaciones de agua caliente y fría, agua tratada, vacío, gas, vapor y electricidad deben hacerse de manera que garanticen el uso adecuado durante el trabajo, así como facilitar las operaciones de mantenimiento y reparación. Los sistemas de desagües se construirán de un material que asegure su integridad frente a las características de los efluentes.
- d) Se tendrán en cuenta las normas de bioseguridad para las instalaciones.

En el caso de los análisis microbiológicos

- e) Las paredes, pisos y techos serán lisos y de fácil limpieza. Las uniones pared-pared, pared-piso y pared-techo tendrán terminaciones sanitarias.
- f) Debe contar con un área para la preparación y distribución de los medios de cultivo. Cuando sea necesario existirá un área para la conservación y multiplicación de microorganismos de prueba y un local para incubadoras.
- g) Debe contar con un área aséptica para la realización del ensayo de esterilidad, con cabina de flujo laminar.
- h) Área de ensayos biológicos: el diseño y las condiciones ambientales dependerán del ensayo a realizar y el riesgo con que se trabaje.
- i) Se contará con un área específica, destinada para colocar y emplear instrumentos analíticos especializados, con temperatura y humedad controlada y estabilizador de voltaje.

- j) Deben tenerse todas las condiciones necesarias para poder realizar las actividades de lavado, preparación y esterilización de materiales; se contará con autoclaves, hornos, sistemas de extracción de aire, entre otras.
- k) Se almacenarán los reactivos, medios de cultivo y otros materiales en lugares que estén separados, teniendo especial cuidado con los líquidos y sólidos inflamables, tóxicos y radiactivos. Se contará con sistemas de extracción y se controlará la temperatura y la humedad relativa en el área requerida.
- l) Desecho de contaminantes químicos y biológicos: 1) Desechos químicos, se deberá contar con un lugar específico, aislado de las áreas de trabajo con contenedores de acuerdo al tipo de solvente a desechar (corrosivos, volátiles, mezclas, etc.) o en base a sus propiedades físico-químicas 2) Desechos biológicos, se debe contar con contenedores especiales para este tipo de desecho (animales de prueba, medios de cultivo, algodón, etc.)
- m) Las instalaciones para animales de laboratorio deberán proporcionar las condiciones fisiológicas y de hábitat, diseñadas de acuerdo a las necesidades y teniendo en cuenta los requerimientos ambientales para cada especie y ensayo a realizar, considerando el nivel de bioseguridad requerido.

3.3.5 Equipos e Instrumentos (7.4.1 Proceso de compras. 7.4.2 Información de las compras. 7.4.3 Verificación de los productos comprados. 7.6 control de los dispositivos de seguimiento y de medición)

El laboratorio deberá contar con el equipo e instrumentos necesarios para la realización correcta de la prueba. En el caso de instrumentos y equipos nuevos, estos deberán ser instalados y/o calibrados por el distribuidor y se debe dejar por escrito un informe de la visita el cual pasará a formar parte del expediente.

El área será responsable:

- Del inventario y los programas de mantenimiento preventivo, calibración y/o verificación del equipo o instrumentos
- De nombrar un responsable de cada equipo o instrumento, indicando también cuales son sus responsabilidades.
- Se deberá contar con una lista de equipos e instrumentos la cual deberá incluir:
 - ⇒ el nombre
 - ⇒ la marca
 - ⇒ el número de inventario
 - ⇒ el número de serie
 - ⇒ el modelo y el año
 - ⇒ la localización
 - ⇒ el costo
 - ⇒ la fecha de adquisición
 - ⇒ la fecha de prestación de servicio

Se debe abrir un expediente para cada equipo o instrumento y éstos deben contener los datos generales, registro, y se deben anexar los reportes de mantenimiento preventivo, correctivo, calibración y verificación.

Cada equipo o instrumento debe contar con su manual de operación en el idioma local. El instructivo de operación debe describir de manera general los pasos a seguir para el manejo del equipo y debe ser colocado en un lugar visible cerca del equipo. Cada equipo deberá tener su registro de uso y/o su carta de control que debe colocarse cerca del equipo.

Se deben establecer programas de mantenimiento preventivo específico para cada equipo, así como programas de calibración o verificación de instrumentos para que éstos operen de tal forma que aseguren que las mediciones efectuadas sean trazables, con patrones nacionales de medición y si es factible con aquellos especificados por el Sistema Nacional de calibración. (SNC) Cuando el equipo esté fuera de especificaciones se deben llevar a cabo las acciones correctivas correspondientes y mientras tanto ponerlo " fuera de servicio". En el caso de instrumentos, se debe demostrar mediante calibraciones que está en condiciones satisfactorias para volver a operar. Cuando proceda, el equipo debe someterse a verificación en servicio entre calibraciones periódicas.

3.3.6 Reactivos (7.4.1 Proceso de compras. 7.4.2 Información de las compras. 7.4.3 Verificación de los productos comprados. 7.5.5 Preservación del producto)

Son los materiales de origen químico o biológico utilizados en los análisis en el laboratorio.

Características de los reactivos:

- Deben ser de calidad apropiada.
- Deben de ser comprados de proveedores certificados (de preferencia), en sus envases originales.
- Deben estar a cargo de un profesional o técnico capacitado.
- Se debe mantener un registro de compra, recepción y distribución para garantizar la continuidad, sobre todo en lo que respecta a sustancias que deben adquirirse con anticipación.
- Deben revisarse a fin de tener la certeza de que los sellos están intactos cuando se reciben en la bodega o cuando se distribuyen. Estas inspecciones deben registrarse colocando las iniciales de la persona a cargo de la inspección y la fecha.

- Los reactivos que den la impresión de haber sido manipulados indebidamente, deberán ser rechazados, salvo en aquellos casos en que pueda comprobarse su identidad y pureza.
- Se debe contar con un POE específico para el transporte, almacenamiento y manejo de reactivos y eliminación de desechos químicos.
- Se debe disponer de locales separados y adecuados para sustancias inflamables, ácidos, sustancias que producen emanaciones, y otros reactivos.
- Todos los lugares de almacenamiento deben estar equipados de acuerdo con normas contra incendios.
- No deben trasladarse de un área a otra.
- Se debe evitar su trasvase.

Con el objeto de promover la seguridad y reducir la contaminación del laboratorio, los reactivos no deben almacenarse en el laboratorio, a menos que haya razones de peso para ello. Los reactivos de utilización rutinaria deben ser mantenidos en el laboratorio.

El agua debe ser considerada como reactivo y debe cumplir especificaciones y requerimientos técnicos para su utilización.

Los reactivos elaborados deben ser preparados en conformidad a procedimientos escritos y cuando fuera aplicable, de acuerdo a farmacopeas u otros textos oficiales y rotularse adecuadamente indicando:

- ⇒ la identificación del reactivo.
- ⇒ la concentración.
- ⇒ el factor de normalización.
- ⇒ la fecha de preparación y vencimiento.
- ⇒ las condiciones de almacenamiento.
- ⇒ las iniciales del técnico responsable.

- **Los animales de laboratorio** son aquellos animales cualesquiera que sea su especie, cepa, calidad microbiológica, sexo o estado de desarrollo, destinados a pruebas biológicas. Para el manejo de los animales deben existir barreras sanitarias, cumplir con condiciones ambientales adecuadas y alimentarlos en forma controlada.
- **Las cepas bacterianas** son cepas "tipo" utilizadas en métodos microbiológicos. Deben estar bajo la responsabilidad de personal experimentado. Consisten en cultivos puros y estables, y es necesario aplicar técnicas apropiadas para garantizar su viabilidad, pureza y estabilidad en las características genéticas, y almacenarlas adecuadamente.
- **Medios de cultivo**, deben ser preparados de acuerdo a procedimientos estandarizados (POE) y deben ser apropiadamente rotulados; controlados para verificar la promoción de desarrollo del medio de cultivo.

3.3.7 Procedimientos operacionales estándar (POE) (4.2 requisitos de la documentación. 4.2.1 Generalidades incisos c, d) y e)

El objetivo es describir en forma detallada las actividades realizadas en el laboratorio a fin de:

- a) Proveer uniformidad, consistencia y confianza en cada una de las actividades llevadas a cabo.
- b) Disminuir errores sistemáticos.
- c) Proveer capacitación y guía para el personal de nuevo ingreso.

Los POE deben ser elaborados por el personal técnico especializado, revisados por el inmediato superior y aprobados por el jefe del laboratorio.

Se deberán preparar POE para los procedimientos generales como:

- **Sistemas de ensayo:** preparación de ambientes, mantenimiento de ambiente, método de muestreo.
- **Operaciones de laboratorio:** toma de muestras, identificación, etiquetado, lavado de material, esterilización de material, almacenamiento de muestras, etiquetado de materiales y reactivos, soluciones.
- **Personal:** capacitación, manipulación de reactivos peligrosos, seguridad en el laboratorio.
- **Materiales de referencia:** Identificación, caracterización, manipulación, recepción, almacenamiento, uso.
- **Archivo:** mantenimiento, distribución y actualización.
- **Equipo:** calibración, mantenimiento preventivo. Para la descripción del uso o manejo del mismo, se usaran instructivos en vez de POE.
- **Métodos de ensayo:** métodos para procesar y analizar las muestras.

Cada POE debe tener en cada una de sus páginas:

- 1) Logotipo y nombre de la organización.
- 2) Departamento o unidad que emite el POE.
- 3) Título.
- 4) Firma de quién lo elabora.
- 5) Firma de quién lo revisa con fecha.
- 6) Firma de quién lo autoriza con fecha.
- 7) Vigencia.
- 8) Fecha de revisión.
- 9) Codificación.
- 10) Número de página y número total de páginas del documento.

3.3.8 Métodos (4.2 Requisitos de la documentación. 4.2.1 Generalidades incisos c), d) y e), 7.5 Producción y prestación del servicio. 7.5.2 Validación de los procesos de la producción y de la prestación del servicio inciso c). 7.5.2 Identificación y trazabilidad)

Son los procedimientos técnicos apropiados para determinar una o más características específicas de un producto o material compatibles con la naturaleza de la muestra a ser probada. Deben estar disponibles en los manuales de métodos o escritos como POE individualizados, en forma clara y precisa, de tal forma que un analista pueda usar el procedimiento e interpretar los resultados. Los POE para los métodos deben seguir el formato preestablecido pero además deben ser complementado con las siguientes informaciones: Principios básicos, equipos, cálculos y estadísticas y referencias.

Existen cuatro opciones de métodos:

- a) **Métodos estándares:** son métodos que fueron objeto de intensa investigación por muchos individuos y laboratorios y se ha demostrado que son los mejores métodos existentes aunque éstos pueden ser antiguos. Estos métodos han sido probados y validados exhaustivamente.
- b) **Métodos oficiales:** son aquellos métodos que se requiere sean utilizados por los laboratorios, por parte del gobierno u organizaciones internacionales. Éstos métodos también fueron validados de forma adecuada antes de ser designados como oficiales.
- c) **Métodos de literatura:** métodos de revistas especializadas que proveen una buena fuente de nuevas metodologías y técnicas, pero que deben ser tratadas con precaución y necesitan ser validadas exhaustivamente antes de su implementación.
- d) **Métodos desarrollados internamente:** son los métodos desarrollados y modificados en los laboratorios como resultado de investigaciones para mejorar o perfeccionar las pruebas y/o para conformar necesidades y problemas individuales. Éstos requieren validación.

Cualquier método nuevo o modificaciones mayores de un método existente, considerado para uso rutinario, debe ser objeto de un proceso de selección riguroso que incluye validación.

Validación de la metodología:

El método de análisis debe ser apropiado a las preguntas que se hacen y debe ser reproducible con resultados confiables. El ensayo debe incorporar las siguientes características.

- a) Exactitud: grado de correlación con el valor real.
- b) Precisión: variación de los resultados representada por la desviación estándar o el coeficiente de variación.
- c) Sensibilidad: respuesta por unidad de sustancia en ensayo, capacidad del procedimiento de prueba para registrar pequeñas variaciones entre concentraciones.
- d) Reproducibilidad: la precisión del procedimiento cuando es realizada bajo diferentes condiciones.
- e) Especificidad: el grado de unicidad de respuesta a la sustancia considerada.
- f) Robustez: habilidad de proporcionar resultados de exactitud y precisión bajo variedad de condiciones.

Los procedimientos de validación más aceptables para nuevos métodos son los estudios colaborativos interlaboratorios.

3.3.9 Material de referencia (7.4. Proceso de compras. 7.4.2 Información de las compras. 7.4.3 Verificación de los productos comprados. 7.5.3 Identificación y trazabilidad)

Es un material del cual uno o más de los valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento técnicamente válido, acompañado por un certificado u otra documentación expedida por un cuerpo certificador.

- 1) Debe estar a cargo de un profesional calificado, responsable de la compra, recepción y distribución.
- 2) Se debe mantener un registro central o archivo que contenga
 - el nombre del material de referencia.
 - el proveedor o importador.
 - el origen.
 - el lote.
 - la fecha de análisis para comprobar si cumple los requisitos estipulados: Protocolos de análisis recibidos o análisis realizados en el laboratorio en este caso: el archivo deberá incluir los resultados de todas las pruebas y comprobaciones utilizadas para establecer el patrón y las iniciales del analista responsable; cualquier material rechazado se identificará claramente y se destruirá o devolverá al proveedor lo antes posible. (POE correspondiente)
 - el lugar y condiciones de almacenamiento.
 - la fecha de vencimiento cuando corresponda.

- el almacenamiento en forma adecuada (POE correspondiente). Este registro deberá contener toda la información relativa a las propiedades del material de referencia.

3) Se debe verificar la calidad del material de referencia cuando las condiciones hayan sido alteradas y rutinariamente, una vez al año.

3.3.10 Auditorías (4.2.1 Generalidades inciso c), 8.2.2 Auditoría interna. 8.5.2 Acción correctiva. 8.5.1 Mejora continua)

Consiste en llevar a cabo un examen sistemático e independiente para determinar si las actividades de calidad y sus resultados cumplen con la documentación preestablecida; comprobar si las mismas son apropiadas para alcanzar los objetivos propuestos y si son implantadas eficazmente.

Las auditorías pueden ser de tipo interno realizadas por personal que no tiene responsabilidad directa en las áreas auditadas. Las auditorías externas las llevan a cabo entidades oficiales para la acreditación.

Las auditorías se pueden aplicar a;

- todo el sistema de calidad.
- algunos elementos del sistema (procedimientos, personal, equipo, áreas de trabajo, etc.).
- procesos.
- servicios productos.

No debe confundirse la auditoría con actividades de vigilancia de la calidad.

Etapas de una auditoría:

- 1) Revisión de documentos.
- 2) Elaboración del plan de auditoría.
- 3) Reunión de apertura.
- 4) Recorrido de las instalaciones.
- 5) Realización de la auditoría: entrevistas, lista de verificación, observación.
- 6) Reunión de cierre.
- 7) Informe de la auditoría.

Auditoría de seguimiento:

En caso de encontrar no conformidad, se realizan las auditorías de seguimiento para verificar la implementación de las acciones correctivas.

4. ENSAYOS BACTERIOLÓGICOS

4.1 Elección del sistema de prueba

En el caso particular de un monitoreo de rutina, en el cual se requiere del ensayo de un elevado número de muestras, para el establecimiento de programas de vigilancia permanentes, el sistema de prueba elegido, debe satisfacer los siguientes requisitos:

- Debe ser un sistema de prueba de corta duración y de fácil realización.
- El sistema de prueba debe ser relativamente económico y de materiales de fácil adquisición.
- Debe ser reproducible.
- Debe ser sensible.
- El sistema elegido debe ser capaz de predecir carcinogenicidad, basándose en un alto índice de correlación mutagénesis-carcinogénesis.

Tomando en consideración los requisitos analizados, los sistemas bacterianos al parecer resultan los más adecuados para los análisis de esta clase, ya que actualmente, las pruebas a corto plazo de este tipo se han convertido en una útil herramienta experimental para investigar el riesgo para la salud humana.

Sistemas bacterianos.- La bioquímica y genética de las bacterias han sido objeto de diversos estudios durante años. No obstante su aparente simplicidad, las bacterias poseen elaborados mecanismos para responder a los daños ocasionados al ADN. Las bacterias por lo tanto, son comúnmente empleadas, tanto en estudios fundamentales de los mecanismos involucrados en la respuesta biológica al daño al ADN, como en ensayos a corto plazo para medir el potencial carcinógeno de algunos compuestos.

Validación de las pruebas bacterianas.- Las pruebas bacterianas han sido validadas comparando los resultados con una amplia variedad de compuestos carcinógenos y no carcinógenos. La sensibilidad como el porcentaje de resultados positivos, la especificidad como el porcentaje de resultados negativos y la exactitud como el porcentaje de resultados correctos.

Auditoria de seguimiento:

En caso de encontrar no conformidad, se realizan las auditorías de seguimiento para verificar la implementación de las acciones correctivas.

4. ENSAYOS BACTERIOLÓGICOS

4.1 Elección del sistema de prueba

En el caso particular de un monitoreo de rutina, en el cual se requiere del ensayo de un elevado número de muestras, para el establecimiento de programas de vigilancia permanentes, el sistema de prueba elegido, debe satisfacer los siguientes requisitos:

- Debe ser un sistema de prueba de corta duración y de fácil realización.
- El sistema de prueba debe ser relativamente económico y de materiales de fácil adquisición.
- Debe ser reproducible.
- Debe ser sensible.
- El sistema elegido debe ser capaz de predecir carcinogenicidad, basándose en un alto índice de correlación mutagénesis-carcinogénesis.

Tomando en consideración los requisitos analizados, los sistemas bacterianos al parecer resultan los más adecuados para los análisis de esta clase, ya que actualmente, las pruebas a corto plazo de este tipo se han convertido en una útil herramienta experimental para investigar el riesgo para la salud humana.

Sistemas bacterianos.- La bioquímica y genética de las bacterias han sido objeto de diversos estudios durante años. No obstante su aparente simplicidad, las bacterias poseen elaborados mecanismos para responder a los daños ocasionados al ADN. Las bacterias por lo tanto, son comúnmente empleadas, tanto en estudios fundamentales de los mecanismos involucrados en la respuesta biológica al daño al ADN, como en ensayos a corto plazo para medir el potencial carcinógeno de algunos compuestos.

Validación de las pruebas bacterianas.- Las pruebas bacterianas han sido validadas comparando los resultados con una amplia variedad de compuestos carcinógenos y no carcinógenos. La sensibilidad como el porcentaje de resultados positivos, la especificidad como el porcentaje de resultados negativos y la exactitud como el porcentaje de resultados correctos.

4.2 Mutagenicidad y carcinogenicidad

Conceptos generales

Mutagénesis.- Una mutación es considerada como una modificación o cambio en la secuencia de bases nitrogenadas que constituyen el material genético (ADN). Este cambio puede ocurrir en los genes (anomalías intragénicas) o en los agrupamientos de genes denominados cromosomas.

Las alteraciones intragénicas pueden producirse por sustitución de bases o por desfasamiento. La primera ocurre por una transversión, en la que una base de un tipo es sustituida por otra de tipo diferente. El desfasamiento consiste en el corrimiento de la secuencia por eliminación o adición de bases.

Las anomalías que se refieren a grupos de genes pueden deberse a arreglos estructurales, (inversiones o traslocaciones) o numéricos. (eliminaciones, deleciones o adquisición de genes o cromosomas) Cuadro 1.

NIVEL DE LA MUTACION	TIPO DE MUTACION	DESCRIPCION
Alteraciones en la secuencia de bases intragénicas.	Sustitución de bases.	Cambio de una base por otra: a) Transición: Purina – Purina, Pirimidina – Pirimidina b) Transversión: Purina – Pirimidina
	Desfasamiento.	Corrimiento de bases por pérdida o adición.
Anomalías en el arreglo de los genes.	Inversión.	Cambio de orientación del gene, manteniendo su posición relativa respecto de los otros genes.
	Traslocación.	Cambio de posición de un gene con relación a otros genes.
Anomalías en el número de genes.	Eliminación.	Pérdida de un gene.
	Duplicación.	Adquisición de una copia extra de un gene.
Aberraciones cromosómicas estructurales.	Rearreglos: traslocaciones, inversiones, anillos.	Cambio en el número, posición u orientación de grupos de genes.
Modificación del número de cromosomas.	Aneuploidía: a) Monosomía b) Polisomía c) Poliploidía	- Segregación cromosómica defectuosa que resulta en pérdida o adquisición de uno o más cromosomas. - Aumento de juegos completos de cromosomas.

Cuadro 1. Alteraciones genéticas (Nava, 1994)

Carcinogénesis.- El cáncer o transformación maligna de las células confiere a éstas la capacidad de crecer indefinidamente y sin control, provocando la formación de grandes poblaciones que eventualmente invaden tejidos diferentes al tejido original. Con respecto al origen de este padecimiento existen dos tipos fundamentales de hipótesis; en una de ellas se señala como factor causal a las alteraciones genéticas, y se basa particularmente en los casos de predisposición hereditaria al cáncer y en la observación de que la mayoría de los agentes carcinogénicos producen mutaciones.

La otra hipótesis propone mecanismos epigénicos que actúan sobre los genéticos, apoyados en la evidencia de revisiones tumorales y en la incapacidad de algunos carcinógenos para producir mutaciones (Trosko, 1978).

Estudios de cáncer en humanos han establecido que un evento mutagénico, es con elevada probabilidad, el factor inicial en algunos tipos de cáncer. Se sabe que la mayoría de compuestos químicos y radiaciones capaces de producir cáncer también son mutagénicos. Por tanto la demostración de actividad mutagénica sugiere que la sustancia puede ser (no necesariamente) carcinógena. La asociación común entre la actividad mutagénica y la carcinogenicidad es la base para el uso de pruebas de mutagenicidad.

4.3 Pruebas de mutagenicidad con *Salmonella* (Ensayo de AMES)

Las pruebas de mutagenicidad para mezclas complejas en ensayos de rutina deben ser de rápida realización, y solamente los sistemas microbianos ofrecen esta ventaja en la identificación de mutágenos potenciales. Uno de los primeros métodos bacterianos para detección de mutágenos y el más frecuentemente usado, utiliza la bacteria entérica *Salmonella typhimurium*. (Ames, 1971)

Si bien las consideraciones generales puntualizadas como importantes en la planeación del aseguramiento de la calidad son aplicables a cualquier ensayo bacteriano, cada uno de ellos requerirá de algunos elementos específicos que es necesario cubrir a fin de asegurar su adecuada realización. A continuación se describen los aspectos más relevantes, en el ensayo de AMES, así como las operaciones que es necesario realizar y controlar para asegurar tanto la integridad de las cepas antes, durante y después de su empleo, así como la validez del ensayo.

Principio.- Esta prueba, utiliza cepas mutantes de la bacteria *Salmonella typhimurium*, que ha sufrido una alteración genética, de manera que no son capaces de producir histidina, un aminoácido esencial para su crecimiento. El sistema en términos generales, se basa en que la presencia de sustancias genotóxicas en el

medio de cultivo que se utiliza en la prueba, provocará, siguiendo los mismos pasos que provocaron la mutación en la bacteria, un proceso inverso denominado reversión, el cual una vez que ha sucedido, permitirá que las bacterias produzcan histidina, y puedan crecer en el medio que han sido sembradas. El medio contiene trazas de histidina y en una primera etapa ocurre un crecimiento de toda la población auxótrofa en presencia del compuesto hasta agotar toda la histidina presente, en una segunda etapa, sólo aquellas bacterias que pudieron mutar por efectos del compuesto probado, podrán continuar creciendo para formar colonias visibles protótrofas.

Las cepas utilizadas en esta prueba, tienen un determinado y constante porcentaje de reversión espontánea, cuando son sembradas en el medio, y sin que haya sustancias genotóxicas presentes, o cuando se adiciona una sustancia con la función de control negativo o blanco. La diferencia entre el porcentaje de reversión espontánea y el porcentaje de reversión inducida, producida por la presencia de las sustancias puestas a prueba, nos indicará si dichas sustancias poseen actividad genotóxica o no. En la prueba se incluye un homogenizado de hígado de roedores (o de otros tejidos de mamíferos), como una aproximación al efecto que puede tener el metabolismo de mamíferos en las sustancias bajo ensayo.

Características Genéticas de la Cepa.- Las cepas empleadas comúnmente son la TA98 y TA 100. Cada cepa de prueba contiene un tipo diferente de mutación en el operón de la histidina.

Adicionalmente a la mutación en el operón de la histidina, las cepas de prueba contienen otras mutaciones las cuales incrementan su capacidad para la detección de mutágenos que son las mutaciones **rfa** y **uvrB**.

Salmonella typhimurium tiene una membrana de lipopolisacárido que es relativamente impermeable, particularmente a los compuestos de alto peso molecular.

La mutación **rfa** o de carácter "rugoso", ocasiona la pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que cubre la membrana bacteriana lo cual facilita la entrada de moléculas grandes que normalmente no penetrarían la pared celular (Maron y Ames, 1983)

Las cepas bacterianas contienen también una mutación que elimina el correcto funcionamiento de los sistemas de reparación del DNA y esto aumenta la sensibilidad de la prueba. La mutación **uvrB** es una delección del gene que codifica una endonucleasa que está involucrada en el funcionamiento del sistema de reparación por escisión.

Las cepas bacterianas TA 100 y TA 98 contienen, además, el plásmido pKM 101 (denominado factor de resistencia, factor-R) y son por esa causa más susceptibles a sufrir mutaciones por sustitución de bases y desplazamiento. El plásmido PKM 101, aumenta la capacidad de reparación pero esta reparación es errónea y esto aunado a la reducción en las funciones de reparación normal produce cepas de prueba que son sensibles a una mayor cantidad de mutágenos.

El plásmido PKM 101 incrementa la susceptibilidad a la mutagénesis provocada por sustancias químicas y luz ultravioleta, lo que da como resultado un incremento en la frecuencia de transiciones y transversiones.

4.4 Cultivo y preparación de cepas bacterianas

Cultivo.- Las cepas de prueba son cultivadas en medio nutritivo Oxoid No. 2, e incubadas durante 48 horas a 37 °C hasta alcanzar una densidad bacteriana de $1-2 \times 10^9$ células por mililitro.

Reislamiento.- Las cepas de prueba son reisladas a partir de reservas permanentes congeladas mediante el sembrado de la bacteria en cajas con medio mínimo enriquecidas con histidina y biotina. Para el reislamiento de cepas con el factor-R, el agar debe contener ampicilina.

Reservas temporales.- Éstas son preparadas a partir de cultivos frescos a los cuales se ha añadido DMSO (dimetil sulfóxido) como agente crioprotector. Las reservas temporales tienen una viabilidad de 2 meses. Son empleadas para su uso rutinario, y tienen la finalidad de evitar la contaminación de las cepas permanentes.

Almacenamiento de las cepas de prueba.- Las reservas permanentes de las cepas de prueba son almacenadas a -70° , (en nitrógeno líquido).

4.5 Confirmación de genotipo de las cepas de prueba

El genotipo de las cepas de prueba debe ser confirmado (a) inmediatamente después de recibir los cultivos, (b) cuando un juego nuevo de cultivos congelados o liofilizados es preparado, (c) cuando el número de revertantes espontáneos esperado cae fuera del rango o (d) cuando hay una pérdida en la sensibilidad a los mutágenos empleados como controles.

Requerimientos de histidina.- Esta característica es confirmada mediante la demostración de los requerimientos de histidina de la cepa para crecer en un medio de agar selectivo.

Mutación rfa.- Las cepas que tienen esta característica deben ser probadas mediante la sensibilidad al cristal violeta. Para esta prueba, la cepa es sembrada (por vaciado) en cajas Petri que contienen agar nutritivo, posteriormente se coloca en un disco estéril de papel filtro impregnado de cristal violeta. Después de 12 horas de incubación, una zona clara de inhibición aparecerá alrededor del disco indicando la presencia de la mutación rfa.

Mutación uvrB.- La mutación uvrB puede ser confirmada mediante la demostración de la sensibilidad a la UV (luz ultravioleta) de las cepas con este tipo de mutación. Para esta prueba, la cepa es sembrada (por vaciado) en cajas Petri que contienen agar nutritivo, posteriormente se cubre la mitad de la caja y la otra es irradiada con UV, se incuba por un lapso de 12 a 24 h. Las cepas con la característica uvrB crecerán solamente en la zona no irradiada de la caja.

Factor-R.- Las cepas con el factor-R deberán probarse para demostrar la presencia del factor que confiere resistencia a la ampicilina; se procede de manera similar a la prueba de mutación rfa pero en lugar del cristal violeta se impregna el disco con ampicilina; después de la incubación las cepas con el factor-R, mostrarán crecimiento alrededor del disco de papel filtro.

Reversión espontánea.- La reversión espontánea (colonias histidina independientes) es medida rutinariamente en el ensayo de mutagenicidad y es expresada como el número de revertantes por caja. Cada cepa de prueba revierte espontáneamente a una frecuencia que es característica de cada una de éstas. (de 20 a 50 para TA98 y de 120 a 200 para TA100)

Fracción S9.- Para los ensayos generales de mutagenicidad se emplea el homogenizado de hígado de rata a partir de ratas inducidas con una mezcla de un PBC (bifenilo policlorinado) como el Aroclor 1254 (altamente carcinogénico), para su preparación se emplean ratas macho de la cepa Sprague-Dawley las cuales son inyectadas con el PBC vía peritoneal y sacrificadas posteriormente. A partir del hígado de la rata se procederá a la preparación de la fracción microsomal (S9) empleada para el ensayo.

Controles positivos.- En cada ensayo de manera rutinaria se incluyen controles positivos usándolos como diagnósticos de mutagenicidad a fin de confirmar las propiedades de la reversión y especificidad, de la cepa así como la eficacia de la mezcla S9.

4.6 Disposición de residuos

Se recomienda el uso de material desechable a fin de evitar la recirculación de material contaminado. El manejo de cultivos o materiales conteniendo controles

positivos de mutagenicidad o carcinógenos se maneja como material riesgoso el cual será dispuesto de acuerdo a la legislación respectiva.

4.7 Precauciones de seguridad

Las cepas de prueba derivan de la *S. typhimurium* tipo LT2, la cual es de baja virulencia, por ello las cepas no representan riesgo para los operadores, a menos que se ingiera intencionalmente ocasionando en este caso diarrea. Sin embargo, las buenas prácticas de laboratorio dictan ciertas precauciones como; nunca pipetear con la boca, no ingerir alimentos, no llevarse objetos a la boca mientras se labora, no beber o fumar en las áreas de trabajo. Esterilizar en autoclave tanto los cultivos en medios líquidos así como cultivos en caja, antes de su disposición, entre otros.

4.8 Puntos críticos de control

Aunque es muy importante manejar con rigor todo el procedimiento, hay algunos puntos de la metodología, que resultan críticos para un buen resultado. A continuación se explican brevemente:

El procedimiento de muestreo y traslado de las muestras, es fundamental para un buen resultado, dado que si éstas no son transportadas en condiciones óptimas pueden sufrir alteraciones que generen resultados confusos. Las muestras deben protegerse de la luz, del aire, de la humedad externa y deben ser transportados a bajas temperaturas para asegurar su integridad.

Otro factor que debe controlarse es la estabilidad genética de las cepas bacterianas ya que si las bacterias pierden sus características originales, los resultados serán erróneos.

Las concentraciones de los medios y reactivos utilizados, deben ser también controlados estrictamente dado que el parámetro se fundamenta en crecimiento bacteriano y las concentraciones de los factores de crecimiento son de gran importancia.

Finalmente dado que se trabaja con medios nutritivos susceptibles de contaminación por microorganismos, los ensayos deben ser realizados en condiciones asépticas y, los medios y reactivos deben esterilizarse para que no interfieran con los resultados.

5. DISCUSIÓN

Nadie pone en tela de juicio los grandes beneficios que puede aportar la implementación de los sistemas de calidad así como el de su aseguramiento en cualquier tipo de organización, ya sea de productos o servicios (incluso la organización familiar) pública ó privada.

Sin embargo y a pesar del grado de conocimiento de los factores que inciden en la calidad, así como de los mecanismos de su implementación y mantenimiento, en muchas ocasiones no llegan a buen término, lo cual no es atribuible a los sistemas en sí. Las causas pueden tener origen en diferentes aspectos, por un lado, las organizaciones adoptan sistemas de calidad más bien como un requisito que es necesario cubrir, alejándose de los principios y filosofía que el termino "calidad" denota.

La implementación de los sistemas de calidad y su aseguramiento, como el planteado en el presente trabajo, basado en la familia de las ISO 9000, no deben limitarse únicamente a un listado de disposiciones (legales) que es necesario cumplir. Es más que eso, se requiere de todo un proceso de sensibilización, no solamente desde el punto de vista meramente académico o marco conceptual, sino que debe ser todo un sistema que facilite, concientice e involucre al total de los actores encargados de la implementación, seguimiento y mejora del ó los sistemas adoptados para ofrecer servicios de calidad.

Para lograr un sistema de calidad eficiente, evidentemente no bastan la disponibilidad y "buenas intenciones" de todos los protagonistas. (Directivos, jefes, analistas, etc;) Se requiere de los recursos necesarios, de tal manera que cualquier sistema que se haya decidido adoptar, y que no sea capaz de sostener la infraestructura, servicios, insumos y personal podrá mantenerse por algún tiempo, e incluso, ser sujeto de certificación, sin embargo solo será cuestión de tiempo para observar el deterioro paulatino del sistema de calidad y por consiguiente, del producto final.

La problemática en la limitación de recursos disponibles, que cualquier organización puede padecer y, las circunstancias legales, institucionales o metodológicas que obligan a trabajar bajo sistemas de calidad, hacen que la implementación de sistemas de calidad, eficientes, no resulte sencilla.

Sin embargo, para el establecimiento de un sistema de calidad efectivo, aún y a pesar de las limitaciones de recursos y modos de trabajo, existen herramientas metodológicas, que los mismos sistemas de control de calidad pueden aportar. Es necesario romper con esquemas de trabajo que muchas organizaciones siguen empleando y que, de acuerdo al desarrollo histórico de las metodologías de la

calidad, se han identificado como prácticas nocivas, que es necesario desterrar, si se desea la transformación de una organización inmadura (respecto a sus estándares de calidad), en una organización que aspire a sistemas de calidad eficientes.

De entre las prácticas dañinas que es necesario eliminar en cualquier organización se tienen identificadas entre otras:

- La práctica de hacer contratos basándose exclusivamente en el precio; el comprar al precio más bajo, con frecuencia conduce a suministros de baja calidad.
- Eliminar cuotas numéricas; estas cuotas suelen enfatizar cantidad y no calidad.
- Desterrar el temor; para lograr incremento en la calidad y en la productividad es importante que la gente se sienta segura.
- Derribar las barreras que impiden que se haga un buen trabajo; los equipos defectuosos y los materiales deficientes constituyen un obstáculo para hacer un buen trabajo.
- Derribar las barreras que hay entre los departamentos o áreas. ; el personal de las diversas áreas deben comunicarse y coordinarse.

Tampoco basta con eliminar prácticas como las mencionadas, se requiere de: adoptar otras como:

- Adquirir una nueva filosofía; no se puede vivir con los niveles comúnmente aceptados de retrasos, fallas, errores, materiales defectuosos y personas no apropiadas en el trabajo.
- Instituir la capacitación en el trabajo; el personal debe estar perfectamente capacitado para poder realizar bien su trabajo.
- Instituir programas vigorosos de educación y reentrenamiento; tener gente buena no es suficiente, se debe fomentar la adquisición constante de nuevas habilidades y conocimientos.
- Crear la estructura que impulse día a día los puntos anteriores; la alta gerencia debe tomar la iniciativa para poner en marcha los puntos anteriores. Esta responsabilidad no puede ser delegada.
- Salario justo; el tener cubiertas las necesidades fisiológicas y de seguridad, motiva al personal a la búsqueda de otros satisfactores, como puede ser, la "calidad".

Si se ha decidido implementar cambios en la organización, pero se sigue trabajando bajo esquemas inmaduros el proceso puede ser largo y doloroso y durante dicho proceso es necesario mantener bajo control las variables que pueden afectar la calidad del trabajo. Para ello existen alternativas metodológicas ofrecidas por los mismos sistemas de aseguramiento de calidad como el descrito en el presente trabajo y que pueden estar al alcance en buena medida, del personal encargado y habilitado en las distintas áreas que conforman una organización.

En el caso que nos ocupa, que es el aseguramiento de calidad en ensayos bacteriológicos, las medidas de control que pueden estar al alcance y se pueden implementar son:

- Diseñar baterías de pruebas de validación de la calidad de los reactivos que se reciban y no correspondan a los idóneos requeridos por la técnica analítica.
- Solicitar y aceptar solamente cepas y sustancias de referencia certificadas (o pueden ser donativos pero se debe, conocer, su procedencia y status).
- Hacer buen uso y mantener en condiciones adecuadas el equipo, áreas, reactivos, cepas, etc.
- Solicitar y promover la capacitación por parte de la organización o capacitarse a modo personal en ámbitos que aporten valor al trabajo.
- Promover intercambios y convenios interinstitucionales (nacionales o extranjeros).
- Fomentar el trabajo en equipo con las demás áreas.

El esfuerzo necesario para lograr trabajar con calidad en la extensión del significado de este concepto, bien vale la pena ya que no solamente se logran beneficios y satisfactores laborales, sino se adquieren hábitos y conciencia del papel que nos toca desarrollar en el proceso de cambio y que a la postre redundará en el beneficio familiar y colectivo de una sociedad que aspire a ser de "CALIDAD".

6. CONCLUSIONES

- ✓ La implementación de los sistemas de aseguramiento de la calidad es una valiosa herramienta en el control de las variables que pueden incidir en la calidad.
- ✓ La familia de normas tipo ISO-9000 (NMX-CC-9001-IMNC-2000) son una guía muy práctica cuando se desea desarrollar un sistema de aseguramiento de calidad.
- ✓ La planeación y desarrollo de los sistemas de control de calidad no puede concebirse si no se cuenta con los suficientes recursos financieros y su adecuada programación.
- ✓ El trabajar bajo los esquemas ISO-9000, puede servir posteriormente para fines de certificación.
- ✓ Aunque las normas ISO-9000 no se refieren específicamente a ensayos microbiológicos, son de gran utilidad ya que, si constituyen modelos de gestión de calidad, que llevados a cabo adecuadamente garantizan resultados confiables en esos métodos analíticos, cuya utilidad e importancia ya se ha discutido.

Ciertamente en cualquier laboratorio que funcione se da por hecho que deber trabajarse con orden y apegado a metodologías específicas; el valor de las ISO-9000, consiste en la sistematización de cada detalle del trabajo, evitando el riesgo de pasar por alto algo a considerar obvio, algo que quede como cabo suelto.

- ✓ El trabajar bajo los lineamientos de las ISO 9000 en los ensayos bacterianos es factible, conveniente y recomendable aún y a pesar de la existencia de barreras institucionales, difíciles de manejar ya que a la larga se contará con las herramientas y experiencia necesaria para controlar las variables que pueden incidir en el correcto desarrollo de un ensayo bacteriano.
- ✓ Las metodologías de aseguramiento de calidad, proporcionan herramientas para mantener bajo control los puntos críticos de un ensayo bacteriano.
- ✓ Mientras no se cuente con los recursos necesarios que optimicen el sistema de calidad, es necesario el implementar prácticas de control que se encuentren al alcance de los encargados de la realización de los ensayos bacterianos como pueden ser: Concientizar a los encargados de la toma de muestras de la importancia de su trabajo. Diseñar pruebas para reactivos que

no cubran al 100% las especificaciones requeridas. Manejo adecuado de las cepas de trabajo. Mantenimiento (hasta donde sea posible) de áreas y equipos.

- ✓ El trabajar con eficiencia los sistemas de aseguramiento de la calidad, no sólo sirve para generar productos (resultados analíticos) de calidad, sino también personal de calidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ames, B.N., et al., (1973a). Carcinogens are mutagens: "A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection." Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285.

Clarke y Monkhouse. (1994). Replantearse la empresa. Financial times. Ediciones Folio. España.

Crosby P. B. (2004). La calidad no cuesta, 15ª Edición. CECSA. México.

Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios. (1999). Manual de Buenas Prácticas de Higiene y Sanidad. Secretaría de Salud; Subsecretaría de Regulación y Fomento Sanitario; México, D.F

Hammer y Champy. (2004), Reingeniería. Grupo editorial NORMA. México.

Juran M. Juran's Quality Handbook. (1999). Mc Graw-Hill. USA.

Marfil R. Mariles A. y Vázquez C. (2004) Material didáctico del diplomado de la calidad y el éxito industrial. Coordinación de Educación Continua, Facultad de Química de la UNAM. México

Maron D. M. and Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research, 113, 173-175.

Nava, L.A. (1993). Selección de una metodología para concentración de contaminantes orgánicos a partir de agua potable, residual y renovada. Determinación mediante bioensayo de la actividad mutagénica de las muestras obtenidas. Tesis de Licenciatura.

NMX-CC-9001-IMNC-2000. Sistemas de gestión de calidad - Requisitos

Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater. (1999). 20th edition AWWA. USA

Trosko, J.E., Chang, Ch., (1978)., "Relationship between mutagenesis and cacinogenesis." Photobiol, 28, 157- 163.

USEPA MANUAL. (1984). Manual of Methods for Virology. USA.

www.who.ch/gpv-documents Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. 1998. (Consultada Octubre del 2004)