



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

IMPLEMENTACIÓN DE UN PLAN DE CALIDAD PARA EL ÁREA DE
BACTERIOLOGÍA EN EL LABORATORIO A.E.A.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

BERNARDO GARCÍA HERNÁNDEZ

ASESOR:

M.C. ANDREA ÁNGELA BECERRIL OSNAYA
CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Implementación de un Plan de Calidad para el área de Bacteriología en el Laboratorio A.E.A.

Que presenta el pasante: Bernardo García Hernández
Con número de cuenta: 300298862 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 17 de mayo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	M. en C. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	QFB. Verónica Ruiz Solorio	
1er. SUPLENTE	QFB. Víctor Hugo Abrego Reyes	
2do. SUPLENTE	QFB. Patricia Jeane Domínguez Quiñones	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/pm

Dedicatoria y agradecimientos.

Quiero agradecer y dedicar este trabajo de tesis a mi familia; a mis padres, por ser el soporte más grande que tengo y a mi hermana, mi mejor amiga.

Gracias mamá, por tus consejos, tu paciencia, tus atenciones y principalmente, gracias por tu cariño...

Gracias papa, por ser mi ejemplo a seguir y el mejor maestro que he tenido en la vida, gracias por tus consejos, tus conocimientos, tus regaños y principalmente gracias por tu apoyo...

Gracias Paulina, por ser mi mejor amiga, y por el apoyo que me brindaste para poder realizar este trabajo, sin ti no lo hubiese realizado; sé que siempre podré contar contigo hermana...

Gracias mamá, Gracias papa y Gracias Paulina, por ayudarme a cumplir mis objetivos de vida.

Gracias a mi asesora, la maestra Andrea Becerril; le agradezco su tiempo y sus consejos; gracias por fomentar en mí el gusto por la Microbiología.

Gracias a todos los profesores del área de Microbiología, gracias por compartir sus conocimientos y brindarme una educación pública de Calidad; gracias por compartir su experiencia conmigo y brindarme su amistad.

Gracias a las compañeras de las oficinas de la coordinación de Q.F.B. y a las compañeras de exámenes profesionales, gracias por su apoyo, sus atenciones y gracias por su amabilidad y compromiso.

Gracias a los Biólogos Ignacio Marroquín Guerrero y Juvenal Barajas González, por darme la oportunidad de aplicar mis conocimientos en el laboratorio A.E.A.

Finalmente gracias a la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN CAMPO-1; Y A TODO SU PERSONAL POR BRINDARME UNA EDUCACIÓN PÚBLICA DE CALIDAD.

GRACIAS A LA FORMACIÓN RECIBIDA EN SUS AULAS ME HE DESARROLLADO PROFESIONALMENTE, Y ORGULLOSAMENTE DIGO: SOY EGRESADO DE LA F.E.S. CUAUTITLÁN CAMPO 1, ORGULLOSAMENTE U.N.A.M.

Came on for the grove street... \m/

Índice.

Introducción.....	5
Presentación.....	5
Objetivo.....	7
Metodología.....	7
Resultados.....	8
PET TD-001-Plan de Calidad para el área de Bacteriología.....	8
PET TD-002-Control de Calidad en el área de Bacteriología.....	14
PET TD-003-Clasificación de los microorganismos manejados en el área de Bacteriología y Normas de Bioseguridad del Nivel 2.....	26
PET TD-004-Tinción de Gram.....	31
PET TD-005-Resiembra y conservación de cepas bacterianas.....	35
PET TD-006-Pruebas bioquímicas para verificación de cepas bacterianas.....	41
PET TD-007-Preparación de los estándares nefelométricos de McFarland.....	50
PET TD-008-Evaluación de medios de cultivo selectivos preparados en placa por la técnica de Miles and Misra	55
PET TD-009-Evaluación de medios de cultivo líquidos y preparados en placa.....	62
Análisis de resultados.....	69
Conclusiones.....	70
Bibliografía.....	71
Anexos	
I. Vocabulario.....	74
II. Listado de Abreviaturas.....	77
III. Referencias.....	78

Implementación de un Plan de Calidad para el área de Bacteriología en el laboratorio AEA.

Introducción.

A.E.A. es un laboratorio de ensayo; que cuenta con profesionistas de amplia experiencia en los servicios de análisis, asesoría, y gestoría relacionados con los problemas de contaminación ambiental; caracterizándose por un constante crecimiento tanto técnico como de los servicios que ofrecen buscando siempre la satisfacción del cliente y el más alto control de la calidad en los resultados obtenidos, lo anterior les ha permitido obtener el reconocimiento de la Secretaria del Medio Ambiente del Gobierno del D.F. y la Secretaria de Ecología del Estado de México, la aprobación de la Comisión Nacional del Agua (CNA), y el Instituto Nacional de Ecología (I.N.E); así como la acreditación ante la Entidad Mexicana de Acreditación (E.M.A).

Los laboratorios de ensayo y la E.M.A.

Antes de comenzar es conveniente explicar de forma breve y concisa que son los laboratorios de ensayo y quien es la entidad mexicana de acreditación; para entender el trabajo descrito a continuación.

Los laboratorios de ensayo o prueba, realizan su actividad a través del análisis de una muestra representativa de un universo, y como resultado de su actividad emiten un informe de resultados.

Por otro lado, la entidad mexicana de acreditación (E.M.A) es la primera entidad de gestión privada en nuestro país, que tiene como objetivo acreditar a los laboratorios de ensayo, laboratorios de calibración, laboratorios clínicos, unidades de verificación y organismos de certificación.¹

Presentación.

La oportunidad de trabajar para el laboratorio A.E.A me fue brindada por los biólogos: Ignacio Marroquín Guerrero, Juvenal Barajas González y Héctor García Bucio, quienes me ofrecieron primeramente el puesto de auxiliar de laboratorio; realizando las siguientes labores: lavado de material, preparación de medios de cultivo, esterilización de material, limpieza y sanitización del área de trabajo; posteriormente me desempeñe como analista de microbiología, realizando análisis de agua residual y potable, por la técnica de filtración en membrana (MF) y número más probable (NMP), preparación y verificación de medios de cultivo y pruebas bioquímicas, mantenimiento y verificación de cepas de referencia, y finalmente capacitación al personal del área de Bacteriología en Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de Microbiología.

Este trabajo se realizó con la finalidad de establecer la aplicación ordenada de las medidas necesarias para eliminar o reducir al mínimo los errores que pueden producirse durante los análisis realizados por parte del personal del área de Bacteriología del laboratorio AEA.

Por lo tanto, es necesario integrar las actividades de control de calidad descritas en los Procedimientos Estándar de Trabajo (PET): “Determinación de coliformes totales y coliformes fecales termotolerantes y *Escherichia coli* presuntiva en agua, por el método del número más probable (NMP)”, y “Detección y enumeración de organismos coliformes totales y organismos coliformes fecales termotolerantes en agua potable y natural por el método de filtración en membrana”; y por otro lado, elaborar los procedimientos adicionales que sean necesarios, buscando que los resultados obtenidos sean seguros y confiables.

Tanto las actividades de control de calidad descritas en los PET, los procedimientos desarrollados, las medidas necesarias para la mejora de los procesos analíticos y todo lo relacionado con las actividades para el control y el aseguramiento de la calidad del área, se han integrado en el documento: “Plan de calidad para el área de Bacteriología”.

Para la elaboración del “Plan de calidad para el área de Bacteriología”, se siguió el Sistema de Gestión de la Calidad descrito en el Manual de Calidad desarrollado por A.E.A, para cumplir con los requisitos generales establecidos en la Norma Mexicana NMX-EC-17025 vigente “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”; todo esto, con la finalidad de mantener la acreditación ante la Entidad Mexicana de Acreditación.

Objetivo.

Mejorar el control de Calidad en el área de Bacteriología del laboratorio A.E.A, implementando un plan de calidad, para complementar los requisitos generales en la acreditación de los laboratorios de ensayo, establecidos en la Norma Mexicana NMX-EC-17025, vigente; y de esta forma tener la certeza de que los resultados obtenidos son seguros, confiables y de alta calidad, garantizando que el proceso analítico utilizado es exacto, confiable y adecuado para el propósito aplicado.

Metodología.

La estructura de los procedimientos incluidos en este trabajo, es la establecida en el Procedimiento Estándar de trabajo AC-001, el cual establece la siguiente estructura:

Nombre			Número
			Revisión
			Vigencia
Elaboro	Aprobó	Autorizó	
1. Tabla de contenido			
2. Objetivo			
3. Alcance			
4. Antecedentes			
5. Definiciones			
6. Formatos y procedimientos complementarios			
7. Reactivos			
8. Materiales y equipos			
9. Proceso			
10. Obligaciones			
11. Responsabilidades			
12. Bibliografía			
13. Anexos			

Resultados.

Los Procedimientos elaborados son los siguientes:

PET TD-001-PLAN DE CALIDAD PARA EL ÁREA DE BACTERIOLOGÍA.		Vigencia
		Revisión
Elaboró	Firma	
Aprobó	Firma	
Autorizó.	Firma	

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	9
2. ALCANCE.....	9
3. ANTECEDENTES.....	9
4. DEFINICIONES.....	10
5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	10
6. PROCESO.....	10
6.1 PERSONAL.....	10
6.2 CONDICIONES AMBIENTALES.....	10
6.3 HIGIENE.....	11
6.4 BIOSEGURIDAD.....	11
6.5 EQUIPOS.....	11

6.6 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	11
6.7 CEPAS DE REFERENCIA.....	12
6.8 MUESTRAS.....	12
6.9 ELIMINACION DE LOS RESIDUOS CONTAMINADOS.....	12
6.10 CONTROL DE CALIDAD INTERNO.....	12
6.11 CONTROL DE CALIDAD EXTERNO.....	12
6.12 INFORME DE RESULTADOS.....	13
7. OBLIGACIONES.....	13
8. RESPONSABILIDADES.....	13
9. BIBLIOGRAFIA.....	13

1.-OBJETIVO

1.1 Establecer la aplicación ordenada de las medidas necesarias para eliminar o reducir los errores que puedan producirse durante las operaciones realizadas; asegurando de esta manera que los resultados obtenidos sean seguros y confiables.

2.- ALCANCE

2.1 Este plan se implementará a las pruebas bacteriológicas de fermentación en tubo múltiple (NMP) y filtración en membrana (FM), para la detección de organismos coliformes totales y coliformes fecales termotolerantes.

3.- ANTECEDENTES

3.1 Este documento se ha desarrollado para integrar en un solo documento, las medidas necesarias para la mejora de los procesos de análisis bacteriológicos, relacionados con las actividades de control de la calidad y el aseguramiento de la calidad de los resultados.

4.-DEFINICIONES

4.1 Cepas de referencia.- Microorganismos definidos por lo menos al nivel de género y especie, catalogados y descritos según sus características y preferiblemente de origen conocido. Normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.²

4.2 Muestra sintética.- Muestra control para verificar y controlar la exactitud del proceso analítico. Las muestras sintéticas se preparan a diferentes concentraciones, de acuerdo con los límites de detección del parámetro. Se deben preparar a partir de soluciones de concentración conocida.³

4.3 Ensayo de aptitud.- La participación en esquemas de ensayo de aptitud con el propósito de evaluar y demostrar la confiabilidad de los datos que produce un laboratorio por un método objetivo.⁴

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

5.1 PET Determinación de Coliformes totales y Coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva en agua, por el método del número más probable (NMP).

5.2 PET Detección y enumeración de organismos Coliformes totales y organismos Coliformes fecales termotolerantes en agua potable y natural por el método de filtración en membrana (FM).

5.3 PET Preparación de material estéril para bacteriología.

5.4 PET Resiembra y conservación de cepas bacterianas.

6.- PROCESO

6.1 PERSONAL: Los análisis microbiológicos serán realizados por personal con experiencia, y/o titulación superior en el área química-biológica; además se contará con la supervisión de una persona con titulación superior en microbiología o equivalente.

El personal del área de bacteriología solo podrá hacer el análisis microbiológico de las muestras cuando se haya reconocido su capacidad para hacerlo, o bajo la supervisión adecuada.⁵

6.2 CONDICIONES AMBIENTALES: El área de trabajo para bacteriología debe ser suficientemente espaciosa, debe mantenerse limpia y ordenada. Se establecerá un programa semanal de monitoreo ambiental completo (mesas, aire, incubadora, refrigerador) empleando placas de sedimentación y frotis de superficies en el área de Bacteriología, para conocer el grado de contaminación existente y eliminar en caso de que estén presentes, las interferencias que puedan afectar de forma directa los resultados obtenidos durante el análisis; y de esta forma mantener las condiciones asépticas del área.⁶

6.3 HIGIENE: Se realizará la limpieza diaria de la mesa de trabajo, antes y después de hacer el análisis de una muestra o muestras, manteniendo una rotación continua de los agentes desinfectantes empleados (etanol al 70%, cloro al 5%, fenol, benzal).⁶

6.4 BIOSEGURIDAD: La bioseguridad incluye una serie de medidas técnicas de carácter preventivo cuyo objetivo es evitar la contaminación del ambiente y del personal del área de bacteriología con el tipo de muestra que se maneja y así reducir la posibilidad o riesgo de enfermedades.⁷

La contención primaria, la protección del personal y del medio ambiente inmediato a la exposición con agentes infecciosos, se obtiene observando las buenas técnicas microbiológicas y a través del uso de equipos de seguridad adecuados.

6.5 EQUIPOS: El mantenimiento, calibración y verificación de los equipos y materiales empleados en el área de bacteriología se realizará en los intervalos especificados, dependiendo de factores tales como la frecuencia de uso.⁸

6.6 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

6.6.1 REACTIVOS: Se verificará la idoneidad de cada lote de reactivo, al inicio y durante el periodo de validez, utilizando como controles positivos y negativos, cepas de microorganismos de referencia.

Se comprobará la esterilidad de cada lote de agua reactivo y medios de cultivo; así como la esterilidad del material de vidrio y sistema de filtración (vaso y embudo).

Todos los reactivos serán almacenados bajo las condiciones especificadas por el fabricante.⁹

6.6.2 MEDIOS DE CULTIVO: Se verificará que los medios de cultivo cumplan con las características adecuadas con respecto a:

- Recuperación o supervivencia de los microorganismos de interés.
- Inhibición o supresión de los microorganismos no deseados.
- Propiedades bioquímicas.
- Propiedades físicas.

Los medios de cultivo deshidratados deben conservarse y ser preparados bajo las condiciones indicadas en el marbete.

Se determinará y verificará el periodo de validez de los medios preparados por el laboratorio, bajo las condiciones de conservación especificadas por el fabricante.

Los lotes de medio de cultivo listos para su uso, deberán ser debidamente identificados y etiquetados, indicando según sea el caso, condiciones de conservación, fecha de preparación, la persona responsable de su preparación y la caducidad del medio.

La evaluación de su efecto en la recuperación o supervivencia de los microorganismos de interés y la inhibición de los microorganismos no deseados, será verificada cuantitativa y

cualitativamente (dependiendo del caso) empleando siempre cepas de referencia.

Se comprobará la funcionalidad de las pruebas bioquímicas utilizadas en el área, durante el periodo de validez, empleando siempre cepas de referencia como controles positivos y negativos.⁹

6.7 CEPAS DE REFERENCIA: Las cepas de referencia son necesarias para demostrar que los medios de cultivo poseen características aceptables, para validar métodos y controlar que mantienen sus propiedades.

Se utilizará siempre que sea posible, cepas de referencia de microorganismos obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.

Las cepas de referencia serán subcultivadas una vez para obtener cepas de reserva, y se realizarán las pruebas bioquímicas que sean pertinentes para verificar su pureza y viabilidad, sin exceder de 5 pases tomando en cuenta el pase en el cual son adquiridas.^{10, 11}

6.8 MUESTRAS: Las condiciones para transporte y conservación de las muestras, deberán ser controladas, manteniendo un registro de estas condiciones. En este registro se documentará claramente quien es el responsable del muestreo, transporte, conservación y su entrega al laboratorio. Una vez obtenidas, las muestras se analizarán lo antes posible.

Las muestras serán identificadas, y se registrará la información relevante: fecha y hora de llegada de la muestra, estado de la muestra en el momento de su entrega, características de la operación de muestreo (fecha de muestreo, personal que realizó el muestreo, condiciones de muestreo, etc.).

Las muestras serán conservadas hasta que se hayan obtenido los resultados del análisis.¹²

6.9 ELIMINACIÓN DE LOS RESIDUOS CONTAMINADOS: Los cultivos generados en los procedimientos bacteriológicos, así como los instrumentos (material de vidrio y/o plástico) para transferir, inocular y mezclar cultivos, serán inactivados mediante el proceso de esterilización en autoclave a 15lb 121°C, el tiempo de esterilización varía de 30 a 60 min. Y se verifica mediante el uso de ampollitas con el microorganismo *Bacillus stearothermophilus*. Este tratamiento debe garantizar la destrucción de todos los microorganismos.^{13, 14}

6.10 CONTROL DE CALIDAD INTERNO: Se establecerá un programa de control de calidad interno. Este programa abarcará las pruebas de técnicas de fermentación en tubo múltiple (NMP) y técnica de filtro de membrana, para organismos Coliformes. El programa debe incluir: uso de muestras inoculadas (sintéticas), uso de materiales de referencia y uso de duplicados.¹⁴

6.11 CONTROL DE CALIDAD EXTERNO: Se deberá participar de forma periódica en ensayos de aptitud donde se utilicen matrices apropiadas. Esto es necesario para verificar la validez de todo el sistema de gestión de calidad del laboratorio.¹⁵

6.12 INFORMES DE RESULTADOS: Si el resultado del recuento es negativo, debe expresarse como “no detectado para una unidad definida”. El resultado no debe expresarse como “cero para una unidad definida” salvo que sea un requisito reglamentario. Los resultados de los análisis cualitativos deben expresarse como “detectado/no detectado en una cantidad o volumen definidos”.¹⁶

7.- OBLIGACIONES

7.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de AEA están obligados a seguirlo íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que en él se indica.

8.- RESPONSABILIDADES

8.1 Es responsabilidad del coordinador de Aseguramiento de la Calidad vigilar la correcta y completa aplicación de este procedimiento.

Es responsabilidad de los gerentes de área comunicar oportunamente al coordinador de Aseguramiento de la Calidad cualquier problema relacionado con la aplicación de este procedimiento para que tome las medidas necesarias para darle solución.

9.- BIBLIOGRAFÍA

9.1 Stándar Methods for the Examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 19th ed. 1995.

9.2 Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación 2002 España.

9.3 Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 “Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración”

PET TD-002-CONTROL DE CALIDAD EN EL ÁREA DE BACTERIOLOGÍA.

Vigencia
Revisión

Elaboró

Firma

Aprobó

Firma

Autorizó.

Firma

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	14
2. ALCANCE.....	15
3. ANTECEDENTES.....	15
4. DEFINICIONES.....	15
5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	15
6. PROCESO.....	15
7. OBLIGACIONES.....	25
8. RESPONSABILIDADES.....	25
9. BIBLIOGRAFIA.....	25

1.-OBJETIVO

1.1 Establecer los lineamientos adecuados para las actividades de control de calidad, control y tratamiento estadístico de los resultados, para asegurar la confiabilidad de los resultados emitidos por el área de bacteriología y que estos sean aptos para los fines de su uso.

2.- ALCANCE

2.1 Este procedimiento es aplicable solo para las pruebas de número más probable y filtro de membrana.

3.- ANTECEDENTES

3.1 Este procedimiento integra las actividades de control de calidad descritas en los PET Determinación de Coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva en agua, por el método del número más probable (NMP) y PET Detección y enumeración de organismos Coliformes totales y organismos Coliformes fecales termotolerantes en agua potable y natural por el método de filtración de membrana (MF).

4.-DEFINICIONES

4.1 Cepas de referencia.- Microorganismos definidos por lo menos al nivel de género y de especie, catalogados y descritos según sus características y preferiblemente de origen conocido. Normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.²

4.2 Monitoreo ambiental.- Actividades documentadas de limpieza y desinfección que toma en cuenta los resultados de vigilancia de las condiciones ambientales y la posibilidad de contaminación cruzada.¹⁷

4.3 Prueba de promoción e inhibición del crecimiento.- Evaluación del efecto de los medios de cultivo sobre la recuperación o supervivencia de los microorganismos de interés y la inhibición de los microorganismos no deseados, a través de la técnica de Miles and Misra.¹⁸

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

5.1 PET Determinación de Coliformes totales y Coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva en agua, por el método del número más probable (NMP).

5.2 PET Detección y enumeración de organismos Coliformes totales y organismos Coliformes fecales termotolerantes en agua potable y natural por el método de filtración en membrana (MF).

6.- PROCESO

6.1 MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS Y MEDIOS EN PLACA

6.1.1 RECOMENDACIONES

6.1.2 Los medios se comprarán en cantidades tales que no haya que almacenarlos por un periodo mayor a un año. Preferiblemente en envases que puedan facilitar su manejo y mantenerlos cerrados el mayor tiempo posible.

6.1.3 Registrar el tipo, la cantidad y el aspecto de los medios recibidos, el número de lote y las fechas de recepción, apertura y caducidad.

6.1.4 Realizar un inventario cada tres meses para reordenar las existencias.

6.1.5 Desechar los medios solidificados, decolorados o que muestren cualquier otra señal de deterioro.⁹

6.2 ALMACENAMIENTO^{19, 20}

6.2.1 Dentro de lo posible, los medios de cultivo desecados deberán conservarse en un lugar seco, protegidos contra la luz, a una temperatura de 2-25°C y en envases siempre cerrados; para casos particulares de medios de cultivo, la temperatura requerida va en un rango de 2-8°C. Inmediatamente después de ocupar la cantidad de medio de cultivo que se necesite, deberán cerrarse de nuevo los envases firmemente.

Si las condiciones de almacenamiento son óptimas, los medios de cultivo desecados (mantenidos en sus envases originales cerrados) conservan sus cualidades durante 5 años, sin embargo debe consultarse la fecha de caducidad, en caso de estar ya vencido, rechazar el lote vencido, antes de emplear los medios de cultivo, realizar pruebas de promoción e inhibición de crecimiento (Miles and Misra para medios selectivos en placa) con cepas de referencia para verificar las propiedades del medio.

6.3 PREPARACIÓN^{21, 22}

6.3.1 Los medios de cultivo utilizados en el área de bacteriología vienen deshidratados y para su preparación se siguen las instrucciones del fabricante especificados en el marbete sin embargo es indispensable seguir las siguientes especificaciones para garantizar el funcionamiento adecuado.

6.3.2 Emplear agua destilada o desmineralizada.

6.3.3 Los medios se preparan en recipientes (generalmente matraces Erlenmeyer) de al menos el doble del volumen del medio a preparar.

6.3.4 Los agares deben agitarse durante el calentamiento; con la finalidad de evitar que el medio se caliente demasiado y este se proyecte con riesgo de quemadura, se emplea un baño de agua en ebullición. Nota: todo tipo de medio de cultivo es sensible al calentamiento por este motivo, no deben calentarse más de lo que especifique el marbete.

6.3.5 Los volúmenes de agua y de medio se medirán con probetas graduadas.

6.4 AJUSTE DEL pH^{23, 24}

6.4.1 El valor del pH depende de la composición del medio de cultivo, de la temperatura que tenga este medio en el momento de su medición y del tratamiento a que se haya sometido dicho medio durante su preparación. Es recomendable hacer la medición del pH después de la esterilización. Para realizar esta medida, utilizar un aparato medidor de pH.

En los medios de cultivo sólidos, la medición del pH se realiza una vez que el medio á solidificado; y en los medios de cultivo líquidos se hace a temperatura ambiente.

El pH, se ajusta al valor indicado para cada medio de cultivo (solo si es necesario), para que

dicho valor se encuentre dentro de los límites de oscilación señalados en el marbete. La corrección (en caso de ser necesaria), se logra por la adición de solución 1N o 0.1N de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio, a una muestra de medio de cultivo exactamente medida. La cantidad de solución correctora necesaria para la totalidad del producto preparado se calcula fácilmente a partir de la cantidad de solución correctora empleada para la muestra del medio de cultivo.

6.5 ESTERILIZACIÓN^{25, 26}

6.5.1 Antes de su esterilización, y dentro de lo posible, es conveniente repartir el medio de cultivo en porciones más pequeñas, por ejemplo, en los recipientes definitivos, excepto placas Petri.

Si las normas de preparación o el marbete no indican otra cosa, la esterilización se lleva a cabo en autoclave, a 121°C/15 minutos. Los periodos de calentamiento y enfriamiento, dependen del tipo de aparato y del volumen del preparado a esterilizar. La esterilización solo se consigue con seguridad cuando se ha desalojado correctamente el aire de la cámara de vaporización de la autoclave y de los recipientes en ella contenidos.

Con este fin se deja fluir ampliamente a la corriente de vapor manteniendo abierta la válvula de purga durante el comienzo de la fase de calentamiento de la autoclave.

Los medios esterilizados se retirarán de la autoclave tan pronto como la presión en la cámara llegue a cero. Nunca se pasarán dos veces los medios por la autoclave. Se comprobará la eficacia de cada proceso de esterilización utilizando suspensiones o tiras de esporas de *Bacillus stearothermophilus* (comerciales).

Nota: Se seguirán las indicaciones del fabricante en cuanto a las condiciones de esterilización.

6.6 VERTIDO EN PLACAS^{27, 28}

6.6.1 Para evitar considerablemente, la formación de gotitas de condensación de agua en la tapa de las placas Petri, debe verterse en las placas el medio de cultivo a una temperatura de 45-55°C.

6.6.2 Remover bien el medio haciendo oscilar en sentido circular su recipiente para garantizar el entremezclado uniforme del medio.

6.6.3 Antes de sembrar las placas puede secarse la superficie húmeda del agar en estufa a 30-40°C.

6.7 CONSERVACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PREPARADOS LISTOS PARA SU USO.^{29, 30, 31}

6.7.1 Los medios de cultivo preparados, tienen solo un tiempo limitado de conservación. Cuando no se indique otra cosa, pueden mantenerse en conservación por varios meses, bajo condiciones adecuadas de conservación.

Preferentemente se prepararán las cantidades de medios estériles que se vayan a utilizar dentro de los límites de tiempo indicados en la tabla 1.

Tabla 1. Tiempo de conservación de los medios de cultivo empleados.

Medios.	Tiempo de conservación.
Agar o medio líquido en tubos de tapón flojo a 4°C.	1 semana
Agar o caldo en tubos de cierre hermético con tapón de rosca a 4°C.	3 meses
Placas con agar vertido con cubiertas flojas en bolsas de plástico selladas (para conservar la humedad) a 4°C.	2 semanas

Para periodos de tiempo más prolongado, se recomienda su almacenamiento a unos 12-15°C. Los medios de cultivo con agar no deben guardarse a temperaturas por debajo de 0°C, pues, de lo contrario, se altera la estructura del gel de los medios de cultivo. Por lo general, es posible su conservación durante 1 o 2 semanas a temperatura ambiente. En cualquiera de los casos deberán protegerse siempre contra la luz.

Si las placas de Petri, preparadas con el medio de cultivo, han de ser conservadas durante cierto tiempo, deberán protegerse además contra el desecamiento del medio de cultivo que contienen, guardándolas empaquetadas en bolsas de plástico impermeable al aire.

Cuando se refrigeren los medios en tubos de fermentación, se incubaran durante una noche antes de utilizarlos y se comprobara que no existen falsos positivos debidos a burbujas de gas.

La comprobación de perdida de humedad en los tubos con caldo se realizara marcando el nivel original en varios tubos de cada lote para comprobar si desciende. Cuando la pérdida calculada supere el 10% se rechazaran los tubos.

Algunas horas antes de su empleo, deberán trasladarse los medios nutritivos a la estufa de cultivo regulada a la temperatura de incubación prevista.

6.8 MONITOREO AMBIENTAL³²

6.8.1 Las condiciones del medio ambiente en las diferentes áreas y del laboratorio de microbiología, tienen un impacto en la calidad de las pruebas que se realizan, debido a que el aire es una fuente de contaminación.

El programa de monitoreo ambiental debe evaluar la efectividad de la limpieza y sanitización, así como también la eficacia de la asepsia del personal. Una evaluación en el área de trabajo, tiene que ser cuantificado en cuanto al contenido microbiano presente en el aire, superficies, equipo, y personal. El objetivo es obtener una estimación representativa de las condiciones microbiológicas en un intervalo de tiempo determinado.

Las fuentes de contaminación del medio ambiente son diversas; se mencionan las más importantes y la forma de prevenir dicha contaminación en la tabla 2.

Tabla 2. Fuentes de contaminación y control adecuado.

FUENTE	CONTROL
Personal	Ropa adecuada que cubra el cuerpo, bata, guantes y cofia (en caso de ser necesario). Número limitado de personal para trabajar en el área.
Proceso de muestra	Adecuada limpieza, sanitización y esterilización, si aplica en el proceso y equipo.
Materiales	Procesos de esterilización y filtración. Manejo adecuado del material y equipo. Métodos de control y prueba para asegurar los niveles de limpieza.
Aire	Mantener las puertas y ventanas cerradas para evitar corrientes de aire.

El muestreo de superficies consiste en pasar un hisopo humedecido con caldo nutritivo por un área determinada (25cm^2) de la mesa de trabajo o el equipo a monitorear, o por placa de contacto; y posteriormente sembrar de forma masiva en medios de cultivo ricos e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.

6.8.2 PROCEDIMIENTO

6.8.2.1 Mesa sin desinfectar:

1. Seleccionar un área de 25cm^2 . Humedecer un hisopo estéril en un tubo que contenga caldo nutritivo (CN) o caldo soya tripticaseina (CST) y frotarlo sobre la zona seleccionada.
2. Enjuagar el hisopo en el tubo que contiene al caldo.
3. Sacar el hisopo y sembrar de forma masiva en la superficie de cada uno de los medios de cultivo elegidos, Agar extracto glucosa y Agar dextrosa saboraud (AEG y SDA) e incubar en la estufa de incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.
4. Realizar la identificación en caso de crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo incubados, mediante las pruebas bioquímicas.

6.8.2.2 Mesa desinfectada.

1. La superficie monitoreada sin desinfectar, se desinfecta con el sanitizante en turno (de acuerdo al rol de sanitizantes semanal) y se deja actuar de 5-10 minutos, posteriormente se humedece un hisopo estéril en un tubo que contenga caldo nutritivo (CN) o caldo soya tripticaseina (CST) y frotarlo sobre la zona seleccionada.

2. Enjuagar el hisopo en el tubo que contiene el caldo.
3. Sacar el hisopo y sembrar de forma masiva en la superficie de cada uno de los medios de cultivo elegidos (AEG y SDA) e incubar en la estufa de incubación a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.
4. Realizar la identificación en caso de crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo incubados, mediante las pruebas bioquímicas.
5. Es válido realizar la prueba con la ayuda de placas de contacto.

6.8.2.3 Monitoreo de la calidad del aire, refrigerador y estufa.

1. Abrir las cajas Petri que contienen los medios de cultivo AEG y SDA, y posteriormente exponerlas al medio ambiente durante 30 minutos. En el refrigerador y en la estufa colocarlas en puntos estratégicos, de tal forma que se cubra por completo el área del equipo.
2. Incubar las cajas Petri en la estufa de incubación a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.
3. Realizar la identificación en caso de crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo incubados, mediante las pruebas bioquímicas.

6.8.3 REPORTE DE RESULTADOS

Los resultados se reportan en la bitácora correspondiente.

6.9 CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO EN N.M.P³³

1. Verificar durante el transcurso de la prueba la calidad del aire en el área de trabajo, colocando una placa Petri con agar de extracto de glucosa y otra con agar dextrosa saboraud, sobre la superficie de las mesas de trabajo, incubándolas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas. Una vez concluido el período de incubación se cuenta el número de colonias y se registra en la bitácora de resultados; la placa no deberá presentar cuentas mayores de 5 UFC/placa; para considerarse adecuada la calidad del aire.
2. Para analizar la esterilidad de los medios de cultivo se tomara una porción representativa de un lote (10%) y se incubara por un periodo a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas, observando si se produjo algún tipo de crecimiento después del periodo de incubación.
3. Para verificar la esterilidad del agua de dilución, se pasarán asépticamente por lo menos 100 ml de agua para dilución a través del filtro de membrana y se colocara el filtro en un medio adecuado para bacterias heterótrofas. Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas, y observar si se produjo algún tipo de crecimiento después del periodo de incubación.
4. Se llevaran a cabo los procedimientos analíticos para cada lote de medios, utilizando como controles positivos y negativos cepas de referencia perfectamente identificadas (ver tabla 3).
5. Se realizaran los análisis por duplicado, en al menos 5% de las muestras o en al menos una muestra por cada tanda de pruebas.
6. Se correrán blancos (tubos sin inocular), controles positivos y negativos, junto con cada lote de muestras.
7. Preparar muestras inoculadas con una cantidad conocida de microorganismos para

hacer una evaluación continua del trabajo desempeñado por el analista.

Tabla 3. Cepas de referencia empleadas como controles para verificar los medios de cultivo empleados en la técnica del NMP.

Medio de cultivo.	Positivo	Negativo
Caldo lactosado (Prueba presuntiva).	<i>Enterobacter aerogenes.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>
Caldo lactosado bilis verde brillante (Col. totales).	<i>Enterobacter aerogenes.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>
Caldo E.C (Col. fecales).	<i>Escherichia coli.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa.</i>

6.9.1 PRECISIÓN DEL MÉTODO³⁴

1. Se determinara la precisión del método; calculando la precisión de los duplicados de cada tipo de muestra estudiada.
2. Analizar por duplicado las primeras 15 muestras, registrando los valores como D₁ y D₂.
3. Calcular el logaritmo de cada resultado. En caso de que en alguna pareja de duplicados uno de los resultados sea cero, se le sumará 1 a ambos resultados antes de calcular los logaritmos.
4. Calcular el Rango (R) de los logaritmos de cada pareja de resultados (R= Log₁ – Log₂).
5. Analizar por duplicado al menos el 10% de las muestras convencionales, y calcular el Rango como se indicó previamente. Si este es superior a 3.27R, la variabilidad del analista es excesiva. Se identificará y se resolverá el problema antes de proseguir con el análisis.

6.9.2 CALCULOS PARA OBTENER LA PRECISIÓN.

$$1) \sum R_{Log} = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$2) \bar{R} = \frac{\sum R_{Log}}{n}$$

$$3) \text{Criterio de precisión: } R \leq (3.27\bar{R})$$

Abreviaturas:

R = Rango.

$\sum R_{Log}$ = Sumatoria de rango de los logaritmos.

\bar{R} = Rango promedio.

6.10 CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO EN F.M. ³⁵

6.10.1 Control de calidad del aire.- Se verifica durante el transcurso de la prueba, mediante la colocación de dos placas de Petri con agar de extracto glucosa y tripticaseina, sobre la superficie de las mesas de trabajo. Se incuban a $37 \pm 0,5$ °C durante 48 ± 3 horas. Una vez concluido el período de incubación se cuenta el número de colonias y se registra en la bitácora de resultados.

6.10.2 Mesas de trabajo.- Se limpian y son sometidas a un programa de rotación de desinfectantes. En este caso se aplican los siguientes: alcohol al 70%, cloro, solución de fenol al 1% diariamente durante una semana cada uno.

6.10.3 Control de calidad analítico

1. Comprobar la esterilidad de los medios, de las unidades de filtración, del agua reactivo y del equipo de filtración (embudo y soporte), utilizando para ello una muestra de agua estéril.
2. Se verificara durante cada análisis, la formación de colonias para cada prueba (coliformes totales y coliformes fecales). Observando la formación de las colonias típicas en la membrana.
3. Para analizar la esterilidad de los medios de cultivo, se tomara una porción representativa de un lote (10%) y se incubara por un periodo a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas, observando si se produjo algún tipo de crecimiento después del periodo de incubación.
4. Para verificar la esterilidad del agua de dilución, se pasarán asépticamente por lo menos 100 ml de agua para dilución a través del filtro de membrana y se colocara la membrana en un medio adecuado para bacterias heterótrofas. Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas, y observar si se produjo algún tipo de crecimiento después del periodo de incubación.
5. Se llevaran a cabo los procedimientos analíticos para cada lote de medios, utilizando como controles positivos y negativos cepas de referencia perfectamente identificadas.
6. Se realizaran los análisis por duplicado, en al menos 10% de las muestras o en al menos una muestra por cada tanda de pruebas.
7. Se correrán blancos (agua reactivo), controles positivos y negativos, junto con cada lote de muestras.
8. Preparar muestras inoculadas con microorganismos para hacer una evaluación continua del trabajo desempeñado por el analista.

6.10.4 Precisión del método

1. Para determinar la precisión del método; se calculara la precisión de los duplicados de cada tipo de muestra estudiada.
2. Analizar por duplicado las primeras 15 muestras, registrando los valores como D_1 y D_2 .
3. Calcular el logaritmo de cada resultado. En caso de que en alguna pareja de duplicados uno de los resultados sea cero, se le sumará 1 a ambos resultados antes de calcular los logaritmos.
4. Calcular el Rango (R) de los logaritmos de cada pareja de resultados ($R = \text{Log}_1 - \text{Log}_2$).

5. Analizar por duplicado por lo menos el 10% de las muestras convencionales, y calcular el Rango como se indicó previamente. Si este es superior a $3.27 \bar{R}$, la variabilidad del analista es excesiva. Se identificará y se resolverá el problema antes de proseguir con el análisis.

6.10.4.1 Cálculos para obtener la precisión

$$1) \sum R_{Log} = R_1 + R_2 + R_3 \dots R_n$$

$$2) \bar{R} = \frac{\sum R_{Log}}{n}$$

$$3) \text{Criterio de precisión: } R \leq (3.27\bar{R})$$

Referencias:

R = Rango.

$\sum R_{Log}$ = Sumatoria del rango de los logaritmos.

\bar{R} = Rango promedio.

6.11 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El control de calidad interno (CI) requiere el análisis de muestras duplicadas por parte del analista para determinar el valor promedio de estas muestras, su desviación estándar y su coeficiente de variación, permitiendo al profesional responsable del aseguramiento de calidad del laboratorio, evaluar la precisión del sistema analítico utilizado para las respectivas determinaciones.

Esta precisión es importante, porque con ella el laboratorio puede evaluar y demostrar que su sistema analítico está en conformidad con los procedimientos e instrucciones de trabajo implantados para sus determinaciones.

Para implementar el control de calidad interno en el área de bacteriología es necesario cumplir con los siguientes aspectos:

- a) Análisis de muestras por duplicado.
- b) Establecer el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para la muestra y aplicar los cálculos estadísticos necesarios.
- c) Implantar una rutina de determinaciones de las muestras duplicadas para formar y capacitar al analista del área.

6.11.1 Determinación del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

La determinación del promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para las muestras control utilizadas en el CI será responsabilidad exclusiva de A.E.A.

Los procesos estadísticos que se utilizarán, deben de realizarse del siguiente modo:

1. Se determinará en la muestra control (muestra sintética) cada uno de los parámetros durante un mínimo de 20 días.
2. La muestra control se analizará de forma idéntica a las muestras problema.
3. Con esos 20 valores, se determinará el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Cálculos:

Promedio

$$(\bar{X}) = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + \dots + n_{20}}{20}$$

Desviación estándar.

$$S = \sqrt{\frac{\sum^{20} (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Coefficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\bar{X}}$$

Abreviaturas:

(\bar{X}) = Promedio

X_i = Valores encontrados.

S = Desviación estándar.

CV = Coeficiente de variación.

N = Número de determinaciones.

N-1 = Grados de libertad.

6.12 CONTROL DE CALIDAD EXTERNO⁴

6.12.1 El laboratorio deberá participar regularmente en ensayos de aptitud que cumplan con los requisitos establecidos en la política de E.M.A. sobre ensayos de aptitud vigente.

6.12.2 El control externo de la calidad no deberá utilizarse solo para detectar observaciones en los resultados obtenidos, sino también para verificar la validez de todo el sistema de gestión de la calidad.

7.- OBLIGACIONES

7.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de a A.E.A. están obligados a emplearla íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que en él se indica.

8.- RESPONSABILIDADES

8.1 Es responsabilidad del coordinador de Aseguramiento de la Calidad vigilar la correcta y completa aplicación de este procedimiento.

Es responsabilidad de los gerentes de área comunicar oportunamente al coordinador de Aseguramiento de la Calidad cualquier problema relacionado con la aplicación de este procedimiento para que tome las medidas necesarias para darle solución

9.- BIBLIOGRAFÍA

6.10 Stándar Methods for the Examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 19th ed. 1995.

6.11 Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación 2002 España.

6.12 Norma Mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 “Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración”.

**PET TD-003-CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS
MANEJADOS EN EL ÁREA DE BACTERIOLOGÍA Y NORMAS DE
BIOSEGURIDAD DEL NIVEL 2.**

Vigencia
Revisión

Elaboró

Firma

Aprobó

Firma

Autorizó.

Firma

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	26
2. ALCANCE.....	27
3. ANTECEDENTES.....	27
4. DEFINICIONES.....	27
5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	27
6. PROCESO.....	28
7. OBLIGACIONES.....	30
8. RESPONSABILIDADES.....	30
9. BIBLIOGRAFIA.....	30

1.-OBJETIVO

1.1 Con este procedimiento se busca clasificar a los microorganismos manejados en el área de bacteriología, y establecer las medidas preventivas para evitar la contaminación del ambiente y del personal que labora en el área reduciendo la posibilidad o riesgo de enfermedades.

2.- ALCANCE

2.1 Este procedimiento deberá seguirse por todo el personal que labore en el área de bacteriología de A.E.A.

3.- ANTECEDENTES

3.1 La bioseguridad incluye una serie de medidas técnicas de carácter preventivo cuyo objetivo es evitar la contaminación del ambiente y del personal que labora en el área de bacteriología con el tipo de muestras que se manejan y así reducir la posibilidad o riesgo de enfermedades ocasionadas por las mismas.⁷

Por otro lado, los microorganismos se clasifican en cuatro grupos según el riesgo que representan para la salud humana; y aunque esta clasificación es muy general y un poco flexible es muy útil para tomar decisiones en cuanto a las normas de bioseguridad que deben seguirse en el laboratorio.

Todo lo anterior se realiza con la finalidad de proporcionar la información necesaria al personal del área de bacteriología, para crear un ambiente laboral seguro y libre de infecciones accidentales.⁷

4.-DEFINICIONES

4.1 Bioseguridad.- La bioseguridad incluye una serie de medidas técnicas de carácter preventivo cuyo objetivo es, evitar la contaminación del ambiente y del personal del área de bacteriología con el material biológico que se maneja y así reducir la posibilidad o riesgo de enfermedades.⁷

4.2 Equipo de protección personal.- Conjunto de elementos y dispositivos, diseñados específicamente para proteger al trabajador contra accidentes y enfermedades que pudieran ser causados por agentes o factores generados con motivo de sus actividades de trabajo y de la atención de emergencias.³⁷

4.3 Microorganismo.- Organismo vivo que puede ser visto con la ayuda de un microscopio, formado por una célula, que se multiplica principalmente por fisión binaria y carece de clorofila.³⁸

4.4 Contaminación.- Inclusión en el medio ambiente, de toda materia o energía en cualquiera de sus estados físicos, que al incorporarse en el ambiente, altera o modifica su composición y condición natural.³⁹

4.5 Enfermedad.- Alteración de la salud.⁴⁰

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

PET TD-Preparación de material estéril para bacteriología

PET TD-Resiembra y conservación de cepas.

Manual de Seguridad e Higiene. A.E.A. Revisión 08.

6.- PROCESO

6.1 Tabla 4. Clasificación de los microorganismos que se manejan en el área de bacteriología del laboratorio A.E.A.⁴¹

Grupo de Riesgo.	Microorganismo.	Tipo de riesgo.
1	<u><i>Acanthamoeba</i></u> Protozoarios <u><i>Plasmodium</i></u> .	Son microorganismos que tienen escaso o riesgo nulo de provocar enfermedades humanas.
2	<u>Virus de la hepatitis B</u> <u>Treponema pallidum</u> <u>Vibrio</u> <u>Bordetella</u> <u>Salmonella typhimurium</u> <u>Escherichia coli</u> patógena <u>Pseudomonas aeruginosa</u> <u>Shigella</u> <u>Entamoeba histolytica</u>	Aquí se agrupan microorganismos que pueden provocar enfermedades humanas de riesgo moderado. En caso de que el personal sufra una infección por alguno de estos agentes, existe tratamiento y cura.
3	<u><i>Brucella</i></u> <u><i>Paracoccidioides</i></u> <u><i>Mycobacterium tuberculosis</i></u> <u><i>Tripanosoma cruzi</i></u> <u><i>Taenia solium adulta</i></u>	Los microorganismos de este grupo pueden provocar enfermedades humanas graves. Sin embargo tienen tratamiento y cura.
4	Virus de fiebre hemorrágica Ebola.	Estos microorganismos provocan enfermedades graves que pueden ser mortales en el ser humano. No hay tratamiento para su cura.

6.2 De acuerdo al cuadro anterior y a los microorganismos manejados en el área de bacteriología (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Enterobacter aerogenes*) las normas de bioseguridad que deben seguirse son las correspondientes al nivel de bioseguridad 2.⁴²

6.3 Seguir las Buenas Prácticas microbiológicas correspondientes al nivel de Bioseguridad manejado en el laboratorio (en este caso el Nivel de Bioseguridad es el 2 como se describió en el punto anterior).

NOTA: El área y todo el personal que labore dentro de la misma deberá cumplir con las Buenas Prácticas microbiológicas descritas a continuación:

6.3.1 La señal de riesgo biológico debe estar colocada a la vista de toda persona que desee entrar al laboratorio. Debe estar en fondo de color rojo y con la señal y el texto en negro.

6.3.2 Debe estar a la vista el nombre del jefe del laboratorio, y precisar si hay requisitos especiales para la entrada al laboratorio, como uso de bata, mascarilla o alguna otra condición.

6.3.3 El acceso al laboratorio debe estar limitado, sobre todo durante el análisis microbiológico.

6.3.4 El personal se debe lavar las manos antes y después de manejar material viable, muestras contaminadas, y antes de dejar el laboratorio. Cuando se utilizan guantes se deben lavar las manos antes de quitarse los guantes y después de quitárselos.

6.3.5 No está permitido comer, beber, fumar, manejar lentes de contacto y aplicarse cosméticos dentro del laboratorio. Los alimentos deben guardarse fuera del área de trabajo en gabinetes o refrigeradores asignados especialmente para este propósito.

6.3.6 No se permite pipetear con la boca. Deben utilizarse instrumentos especiales como pipetas automáticas o bulbos de seguridad.

6.3.7 Se debe evitar crear aerosoles o derrames.

6.3.8 La superficie de trabajo debe ser desinfectada antes de iniciar el trabajo y después de cualquier derrame. Los desinfectantes deben evaluarse previamente para determinar la concentración más adecuada para su uso.

6.3.9 Todos los cultivos y material contaminado deben ser sometidos a un proceso de inactivación antes de ser desechados.

6.3.10 Cualquier persona ajena al área de bacteriología tiene estrictamente prohibida la entrada.

6.3.11 El personal debe recibir capacitación antes de iniciar manejo de agentes infecciosos.

6.3.12 Se debe tener extrema precaución con el manejo de objetos punzo cortantes como agujas, portaobjetos, pipetas, tubos capilares, y otros; cuando sea posible deben sustituirse por material de plástico. Su eliminación debe llevarse a cabo de acuerdo con lo establecido en la norma NOM-087-ECOL-1995.

6.3.14 El personal del área debe contar con el equipo de protección personal adecuado para realizar su trabajo.

El equipo de protección personal requerido para el nivel de bioseguridad manejado en el área de bacteriología de A.E.A. es el siguiente:

6.3.14.1 Bata blanca (limpia) de algodón, guantes desechables, cubre boca, zapatos de seguridad y gafas de seguridad.

NOTA: Por ningún motivo la bata debe utilizarse fuera del laboratorio, o en áreas administrativas y queda estrictamente prohibido usarla fuera de las instalaciones del laboratorio.

7.- OBLIGACIONES

7.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de A.E.A están obligados a emplearlo íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que en él se indica.

8.- RESPONSABILIDADES

8.1 Es responsabilidad de todo el personal la correcta y completa aplicación de este procedimiento, así como del Gerente del Departamento Técnico y de Desarrollo vigilar su aplicación.

Es responsabilidad de los analistas comunicar oportunamente al gerente Técnico y de Desarrollo cualquier problema relacionado con la aplicación de este procedimiento para que tome las medidas necesarias para darle solución

9.- BIBLIOGRAFÍA

9.1 Standard Methods for the examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 19th ed. 1995.

9.2 Manual para el Manejo de Residuos Peligrosos y Bioseguridad. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Secretaría de Salud. México 2000.

PET TD-004-TINCIÓN DE GRAM.

Vigencia
Revisión

Elaboró

Firma

Aprobó

Firma

Autorizó.

Firma

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....32

2. ALCANCE.....32

3. ANTECEDENTES.....32

4. DEFINICIONES.....32

5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....32

6. REACTIVOS..... 32

7. MATERIAL Y EQUIPOS.....33

8. PROCESO.....33

9. OBLIGACIONES.....33

10. RESPONSABILIDADES.....33

11. BIBLIOGRAFIA.....34

1.-OBJETIVO

1.1 Describir la técnica de coloración diferencial e interpretar los resultados de la misma, distinguiendo entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

2.- ALCANCE

2.1 Este procedimiento deberá ser aplicado durante la prueba de verificación de cepas de referencia utilizadas como controles en el desarrollo de las pruebas de Coliformes totales y Coliformes fecales termotolerantes por NMP y Filtración en membrana.

3.- ANTECEDENTES

3.1 Un carácter taxonómico importante de las bacterias es su respuesta a la coloración de Gram. Esta propiedad tintorial es fundamental, ya que se relaciona con muchas otras propiedades morfológicas. El procedimiento para la tinción de Gram se inicia con la aplicación de un colorante básico, cristal violeta. Luego se aplica una solución de yodo, después se tratan con alcohol-acetona y finalmente, se aplica un colorante de contraste, la safranina. La base de la reacción diferencial de la tinción de Gram es la estructura de la pared celular.⁴⁵

4.-DEFINICIONES

4.1 Gram positivas (bacterias).- organismos que resisten la decoloración y retienen el complejo cristal violeta – yodo, aparecerán de color azul-violeta al microscopio.⁴³

4.2 Gram negativas (bacterias).- organismos que pierden el color inicial del cristal violeta tras la decoloración y toman el color rosa debido al segundo colorante, la safranina.⁴³

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

PET TD-005 Resiembra y conservación de cepas bacterianas.

6.- REACTIVOS.

- Cristal violeta.
- Lugol.
- Alcohol-Acetona
- Safranina
- Agua destilada
- Aceite de inmersión.

7.- MATERIAL Y EQUIPOS.

- Porta objetos.
- Asa bacteriológica.
- Goteros.
- Varillas de vidrio.
- Microscopio óptico.
- Mechero.

8.- PROCESO

8.1 Colocar en un portaobjetos perfectamente limpio, una gota de agua destilada estéril.

8.2 Con un asa bacteriológica, tomar una asada de una colonia aislada y homogeneizar sobre el portaobjetos y fijar con calor.

8.3 Agregar unas gotas de cristal violeta durante 1 minuto.

8.4 Enjuagar con agua.

8.5 Adicionar unas gotas de Lugol por 30 segundos y decantar.

8.6 Decolorar con la mezcla alcohol – cetona de 5 a 10 segundos.

8.7 Agregar safranina durante 1 minuto.

8.8 Enjuagar con agua.

8.9 Esperar a que seque el frotis, y observarlo al microscopio; primero enfocar con el objetivo de 10X, posteriormente observar con el objetivo de 40X y finalmente con el objetivo de 100X, con aceite de inmersión

8.10 Las bacterias Gram positivas aparecerán coloreados de azul-violeta, mientras que las Gram negativas se observaran de color rosa-rojo.⁴⁴

9.- OBLIGACIONES

9.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de A.E.A están obligados a emplearlo íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que en él se indica.

10.- RESPONSABILIDADES

10.1 Es responsabilidad del gerente Técnico y de Desarrollo vigilar la correcta y completa aplicación de este procedimiento.

Es responsabilidad de los analistas comunicar oportunamente al gerente Técnico y de Desarrollo cualquier problema relacionado con la aplicación de este procedimiento para que tome las medidas necesarias para darle solución.

11.- BIBLIOGRAFÍA

11.1 Stándar Methods for the examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 19th ed. 1995.

11.2 Jawetz Ernest; Melnick L. Joseph; Adelberg A. Edward. *Microbiología Médica*. 12^a El manual moderno. México, 1987. Pag:28.

11.3 Londoño O. Amparo, Quintero M. María L., Hernández T. María G. *Manual de microbiología general 1, para QFB*. U.N.A.M. 2005. Pág.: 23-26.

PET TD-005-RESIEMBRA Y CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS.

Vigencia
Revisión

Elaboró

Firma

Aprobó

Firma

Autorizó.

Firma

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	36
2. ALCANCE.....	36
3. ANTECEDENTES.....	36
4. DEFINICIONES.....	36
5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	37
6. REACTIVOS.....	37
7. MATERIALES Y EQUIPOS.....	37
8. PROCESO.....	37
9. OBLIGACIONES.....	39
10. RESPONSABILIDADES.....	39
11. BIBLIOGRAFIA.....	39
12. ANEXOS.....	40

1.-OBJETIVO

1.1 Obtener cepas de reserva y de trabajo, describiendo el procedimiento utilizado en A.E.A. para la resiembra, conservación y verificación bioquímica, de las cepas bacterianas utilizadas como controles durante la realización de los análisis bacteriológicos.

2.- ALCANCE

2.1 El procedimiento aquí descrito se usará para el manejo y conservación de las cepas bacterianas adquiridas por A.E.A. Estas cepas deberán ser suministradas por la American Type Culture Collection (ATCC), o por alguna dependencia federal mexicana.

Las cepas bacterianas adquiridas se utilizan de la siguiente manera:

Escherichia coli.- Control positivo para Coliformes totales y fecales

Enterobacter aerogenes.- Control positivo para Coliformes totales y control negativo para Coliformes fecales.

Pseudomonas aeruginosa.- Control negativo para Coliformes totales y fecales.

Salmonella typhimurium.- Control positivo para la determinación de Salmonella en lodos.

3.- ANTECEDENTES

3.1 El uso de cepas bacterianas clasificadas por ATCC, nos permite asegurar la validez de los resultados bacteriológicos emitidos por el laboratorio. Además de dar cumplimiento a la política específica sobre control de calidad manifestada en el manual de calidad sección 3 inciso (i).

Los cultivos de referencia se utilizan en los laboratorios de microbiología para evaluar la calidad de los medios de cultivo, controlar la calidad de los resultados que emite el laboratorio, validar los métodos microbiológicos, determinar la efectividad de los desinfectantes, entre otros.

Los cultivos microbianos deben proceder de colecciones nacionales o internacionales registradas y contar con el certificado de origen correspondiente.

El manejo y almacenamiento de cultivos de referencia en el laboratorio debe efectuarse de tal forma que se reduzca la posibilidad de variaciones genotípicas y fenotípicas, así como el riesgo de contaminación.^{10,11}

4.- DEFINICIONES

4.1 Cepa bacteriana.-Un cultivo puro de microorganismos, compuesto por los descendientes de un solo aislamiento.⁴⁵

4.2 Cepas de reserva.- Cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia.⁴⁶

4.3 Cepas de trabajo.- Cepas obtenidas de la misma manera que las cepas de reserva y que se utilizan como control positivo y negativo en los análisis realizados.⁴⁶

4.4 Cepas de referencia.-Microorganismos definidos por lo menos al nivel de género y

especie, catalogados y descritos según sus características y preferiblemente de origen conocido. Normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.⁴⁶

4.5 Pruebas Bioquímicas.- Serie de pruebas utilizadas principalmente para evaluar los procesos metabólicos empleados por los microorganismos así como los productos derivados de ellos.⁴⁷

4.6 Pase.- Se define como la transferencia de microorganismos de un cultivo viable a un medio fresco con crecimiento de microorganismos.¹¹

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

5.1 PET TD-Preparación de material estéril para bacteriología.

5.2 PE TD-004-Tinción de Gram

5.3 PET TD-006-Pruebas Bioquímicas para la verificación de cepas bacterianas.

5.4 PET TD-008-Evaluación de medios de cultivo preparados en placa, por la técnica de Miles y Misra.

6.- REACTIVOS.

- Aceite mineral estéril.
- Agar nutritivo.

Preparar de acuerdo a las indicaciones señaladas por el fabricante en el marbete.

7.-MATERIALES Y EQUIPOS.

- Tubos de vidrio de 16mm x 125mm con tapón de rosca.
- Pipetas graduadas de 1mL
- Gradilla
- Bulbo o perilla.
- Asa bacteriológica calibrada de 4mm
- Matraz Erlenmeyer 1000mL
- Frascos de vidrio para reactivos.
- Mechero Fisher.
- Incubadora.
- Termómetro calibrado.

8.- PROCESO

8.1 Limpiar y sanitizar la mesa de trabajo, siguiendo el rol de sanitizantes establecido en el área de bacteriología.

8.2 Encender el mechero y regular la flama, esperar 15 minutos antes de comenzar a trabajar.

8.3 Tomar el tubo que contiene la cepa de referencia, remover el tapón, y flamear la boquilla del tubo en la flama del mechero.

8.4 Con la otra mano tomar el asa bacteriológica, flamearla hasta el rojo vivo, enfriarla, tomar una asada de la cepa de referencia y transferirla a otro tubo con agar nutritivo inclinado. Sembrar paralelamente otros 4 tubos, para contar con dos tubos de reserva para realizar la resiembra programada (cada 6 meses) y tres tubos de trabajo.

8.5 Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.

8.6 Después del periodo de incubación, sellar el tubo con aceite mineral estéril (el aceite deberá ser de muy buena calidad, de lo contrario puede ser perjudicial para el cultivo) y posteriormente sellar con papel parafilm.

8.7 Rotular cada uno de los tubos con los siguientes datos: Nombre del microorganismo, número de pase a partir de la cepa madre, fecha de resiembra, analista que realizó el pase, número de ATTCC (en caso de ser adquiridas en una institución autorizada anotar el número asignado por esta) y fecha de la próxima resiembra.

8.8 Conservar los tubos con las cepas bacterianas, en refrigeración a 4°C .

8.9 Al seleccionar la cepa de trabajo, abrir el tubo (cerca del mechero) y remover el tapón de aceite, y otorgarle dos meses de caducidad.

Nota: el aceite deberá ser recolectado en un vaso de precipitados e inactivado en la olla de presión, bajo las condiciones adecuadas.

8.10 La verificación de las propiedades bioquímicas de las cepas de reserva, se hará utilizando las pruebas bioquímicas que vienen descritas en las especificaciones y certificado del microorganismo en cuestión. Las pruebas de verificación son las siguientes:

- Prueba de Movilidad.- Con esta prueba se determina la capacidad de una bacteria de poder desplazarse, gracias a la presencia de flagelos; esta se puede evaluar por medio de una inoculación en medios semisólidos como el medio MIO.
- Pruebas IMVIC.- El significado de las siglas es: I (indol), M (rojo de metilo – MR) V (Vogues Proskauer- VP), I (vocal para dar eufonía al término), C (Citrato). Son utilizadas principalmente para la diferenciación rápida de Enterobacterias.
- Prueba de la Ornitina.- Se utiliza para determinar la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina, con la resultante alcalinidad.

- Prueba de fermentación de lactosa y de glucosa.- Esta prueba determina la capacidad de una bacteria para atacar un hidrato de carbono incorporado en un medio de desarrollo basal, junto con la determinación de la posible producción de H₂S.

8.11 Las cepas se conservaran en tubos con tapón de rosca, perfectamente cerrados a una temperatura de 4°C. Las cepas de reserva se verificaran cada 6 meses después de realizar el pase correspondiente.

Se anexa el diagrama para la obtención de las cepas de reserva y de trabajo.¹¹

9.- OBLIGACIONES

9.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de A.E.A, están obligados íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que en él se indica.

10.- RESPONSABILIDADES

10.1 Es responsabilidad del usuario del procedimiento aplicarlo, sujetándose estrictamente a lo establecido en este documento; en caso de no poderlo cumplir o de detectar desviaciones deberá dar aviso al momento a su jefe inmediato.

10.2 Es responsabilidad del Gerente Técnico y de Desarrollo asegurar el correcto cumplimiento de este procedimiento. En caso de desviaciones debe de tomar las decisiones adecuadas sobre los resultados de los análisis, así como aplicar las medidas necesarias para establecer las condiciones especificadas en este procedimiento.

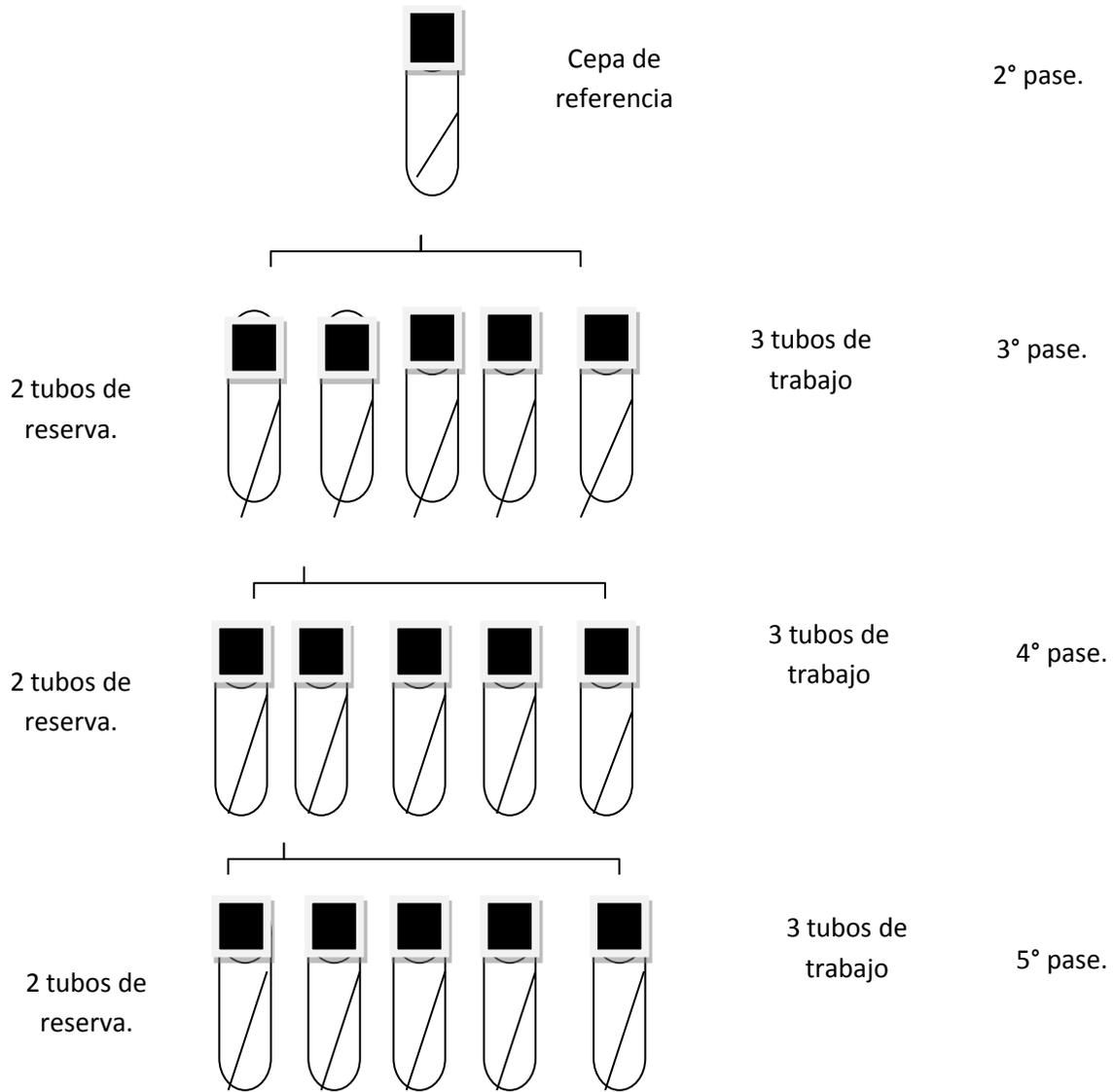
11.- BIBLIOGRAFÍA

11.1 Manual de Técnicas de Laboratorio. 2ªEd. INDRE. México D. F.

11.2 Pelczar Michael, Chan. Elementos de Microbiología. Mc Graw Hill 1984. México

11.3 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2011 Vol. II. Pc: 2599 – 2600.

12. ANEXO.



PET TD-006-PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA VERIFICACION DE CEPAS BACTERIANAS.

Vigencia
Revisión

Elaboró

Firma

Aprobó

Firma

Autorizó.

Firma

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	42
2. ALCANCE.....	42
3. ANTECEDENTES.....	42
4. DEFINICIONES.....	42
5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	42
6. REACTIVOS.....	43
7. MATERIAL Y EQUIPOS.....	44
8. PROCESO.....	44
9. OBLIGACIONES.....	48
10. RESPONSABILIDADES.....	48
11. BIBLIOGRAFIA.....	48
12. ANEXOS.....	49

1.-OBJETIVO

1.1 Describir las pruebas bioquímicas utilizadas en el laboratorio A.E.A., para verificar que las cepas bacterianas utilizadas como controles positivos y negativos, conserven sus características metabólicas y morfológicas, asegurando que los resultados obtenidos son confiables.

2.- ALCANCE

2.1 El procedimiento aquí descrito se usará para verificar las características de las siguientes cepas de referencia.

Escherichia coli

Enterobacter aerogenes

Pseudomonas aeruginosa

Salmonella typhimurium

Nota: No se especifica la clasificación ATCC ya que la adquisición de las mismas puede ser a través de alguna dependencia federal autorizada o proveedor independiente.

3.- ANTECEDENTES

3.1 El PET TD-005 Resiembra y conservación de cepas será complementado con la descripción de las pruebas bioquímicas aquí descritas; asegurando que los controles utilizados en el desarrollo de las pruebas bacteriológicas cumplen con los requisitos establecidos y obteniendo las respuestas esperadas.

4.-DEFINICIONES

4.1 Clasificación ATCC.- ATCC es un centro de investigación biológica, privado sin fines de lucro cuya misión está enfocada en la adquisición, autenticación, producción, preservación, desarrollo y distribución de microorganismos de referencia, líneas celulares y otros materiales para la investigación científica.⁴⁸

4.2 Cepas de referencia.- Microorganismos definidos por lo menos al nivel de género y de especie, catalogados y descritos según sus características y preferiblemente de origen conocido. Normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.⁴⁶

4.3 Pruebas bioquímicas.- serie de pruebas utilizadas principalmente para evaluar los procesos metabólicos empleados por los microorganismos así como los productos derivados de ellos.⁴⁷

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

5.1 PET TD-005 Resiembra y conservación de cepas.

5.2 PET TD-004 Tinción de Gram.

6.- REACTIVOS.

- Aceite mineral estéril
- Reactivo de Kovacs.
Reactivo de marca comercial.
- Indicador Rojo de Metilo.

Indicador Rojo de metilo.....	0.1g
Etanol al 95%.....	300mL
Agua destilada.....	200mL

Disolver 0.1g de rojo de metilo en 300 mL de etanol en un matraz aforado de 500mL, una vez disuelto aforar a 500 mL con agua destilada.

Verter el indicador en un frasco para reactivos, etiquetarlo adecuadamente y mantener el reactivo en refrigeración (4°C) mientras no sea usado, dándole una caducidad de 3 semanas.⁴⁹

- KOH al 40% (agente oxidante)

KOH.....	40g
Agua destilada.....	100mL

Nota: los hidróxidos de sodio y potasio son extremadamente cáusticos, de modo que es necesario evitar la exposición de la piel ya que pueden producirse quemaduras dolorosas. Si ocurren salpicaduras, lavar la zona de inmediato con abundante agua. Antes de trabajar con ácidos o álcalis concentrados, colocarse el equipo de protección personal indicado en la hoja de seguridad del reactivo y trabajar dentro de la campana.

El KOH es un reactivo muy higroscópico, por lo que se recomienda pesarlo con rapidez y disolverlo en 50mL de agua destilada en un vaso de precipitados. Mientras se disuelve y colocar el recipiente en un baño de agua fría para controlar la temperatura. Enfriar la solución y transferirla a un matraz aforado de 100mL y aforar con agua destilada.

Verter el indicador en un frasco para reactivos, etiquetarlo adecuadamente y mantener el reactivo en refrigeración (4°C) mientras no sea usado, dándole una caducidad de 3 semanas.⁵⁰

Alfa-naftol

- Alfa-naftol.....5g
- Etanol al 95%.....100mL.

Disolver los 5g del alfa naftol en 50mL de etanol al 95% en un vaso de precipitados.

Transferir la solución a un matraz aforado de 100mL y aforar con etanol al 95%.

Transferir la solución a un frasco para reactivos, etiquetarlo adecuadamente y almacenarlo en refrigeración (4°C). Darle caducidad de 3 meses.⁵⁰

7.- MATERIAL Y EQUIPOS.

- Cepas de referencia
- Tubos con las pruebas bioquímicas: MIO, LIA, TSI, Citrato, Caldo MR-VP.
- Matraces aforados de 100 y 500mL.
- Vasos de precipitados
- Espátula.
- Gradillas
- Goteros
- Asa microbiológica calibrada de 4mm.
- Mechero Fisher
- Incubadora Rios- Rocha a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- Balanza granataria

8.- PROCESO

8.1 PRUEBA DE MOTILIDAD INDOL ORNITINA (MIO).^{47, 51}

En esta prueba se busca determinar la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una diamina con la resultante alcalinidad del medio, la capacidad de un microorganismo para producir indol a partir del triptófano y la motilidad de un microorganismo por la presencia de flagelos.

8.1.1 Procedimiento.

1. Con un asa recta, previamente flameada, tomar una asada de una colonia aislada de 24hr, y picar el medio MIO hasta el fondo, cuidando seguir la misma trayectoria de entrada y salida; para evitar extender el inóculo y con ello obtener falsos positivos, en la lectura de motilidad.
2. Adicionar una ligera capa aceite mineral estéril, colocar el tapón del tubo.
3. Incubar el medio 24horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
4. Para la lectura del Indol, se agregan de 1 a 3 gotas del reactivo de Kovacs.
5. Los resultados de esta prueba deberán compararse con las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Resultados. Lectura de la descarboxilación de la ornitina.

Lectura después de 8hr.	Lectura después de 24hr.	Interpretación.
Morado	Morado	Fermentación de glucosa(-) Descarboxilación(-)
Amarillo	Amarillo	Fermentación de glucosa(+) Descarboxilación(-)
Amarillo	Purpura turbio/Amarillo- purpura apagado.	Fermentación de glucosa(+) Descarboxilación(+)

Nota: es importante revisar el tubo a las 8 horas para poder apreciar el cambio de color en caso de que este ocurra.

Tabla 6. Resultados. Lectura de Indol y motilidad.

Indol.	
Lectura después de 24hr.	Interpretación.
En segundos aparece un anillo rojo en la interfase del medio.	Positivo. (+)
No hay ningún desarrollo de color o aparece un anillo turbio.	Negativo. (-)
Motilidad.	
Lectura después de 24hr.	Interpretación.
Crecimiento sobre la línea de inoculación y hacia los lados.	Positivo. (+)
Crecimiento únicamente sobre la línea de inoculación.	Negativo. (-)

8.2 PRUEBA DE ROJO DE METILO Y VOGES – PROSKAUER (MR- VP) ^{47,52}

Rojo de Metilo.- Evidenciar la capacidad de un microorganismo para producir y mantener estables los productos finales ácidos a partir de la fermentación de la glucosa, venciendo la capacidad del buffer de fosfatos del medio.

Voges – Proskauer.- Determinar la capacidad de los microorganismos para producir un producto final neutro, acetilmetilcarbinol (acetoina), a partir de la fermentación de la glucosa.

8.2.1 Procedimiento.

1. Con un asa bacteriológica, tomar una colonia aislada de 24hr.
2. Sembrar con inóculo cargado, el tubo con caldo MR-VP e incubar 24-48 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
3. La lectura de Rojo de Metilo (MR) se efectuara después de las 24 horas de incubación: agregar la mitad del caldo inoculado en un tubo estéril y adicionar de 2-3 gotas del indicador rojo de metilo.
4. La porción restante del medio inoculado se incuba por otras 24 horas a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
5. La lectura de Voges-Proskauer (VP), se hará a las 48 horas de incubación, agregando 2 o 3 gotas del indicador: KOH al 40% y alfa naftol.
6. Los resultados de esta prueba deberán compararse con los resultados descritos en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados. Lectura de las pruebas Rojo de metilo y Voges – Proskauer.

Rojo de metilo a las 24hr.	Voges – Proskauer a las 48hr.	Interpretación.
Desarrollo de color rojo en la superficie del medio.	Ausencia de color rojo, puede formarse un color cobrizo.	Rojo de metilo (+). Voges – Proskauer (-).
Ausencia de color rojo, puede formarse un color cobrizo.	Desarrollo de color rojo en la superficie del medio.	Rojo de metilo (-). Voges – Proskauer (+).

8.3 PRUEBA DE CITRATO^{47,53}

Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con la alcalinidad resultante.

8.3.1 Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica, tomar una colonia aislada de 24hr, e inocular la superficie del medio por estriado.
2. Incubar por un periodo de 24 a 48 horas a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con la tapa floja, ya que la reacción requiere oxígeno para llevarse a cabo.
3. Los resultados de esta prueba deberán compararse con los resultados descritos en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados. Lectura de la prueba Citrato.

Lectura después de 24hr.	Interpretación
Crecimiento con un intenso color azul en el pico de flauta.	Positivo. (+)
Ausencia de crecimiento y ningún cambio de color	Negativo. (-)

Nota: es importante aflojar los tapones de los tubos, de lo contrario se pueden obtener resultados falsos negativos ya que la reacción requiere oxígeno para llevarse a cabo.

8.4 AGAR HIERRO LISINA (LIA)^{47,54}

Determinar la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina con la resultante alcalinidad y la capacidad de un microorganismo para liberar enzimáticamente H_2S gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados para producir una reacción coloreada visible, negra.

8.4.1 Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica, tomar una colonia aislada de 24hr, picar el medio hasta el fondo, y posteriormente estriar sobre la superficie del mismo.
2. Incubar el medio 24hr a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
3. Los resultados de esta prueba deberán compararse con los resultados descritos en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Resultados. Lectura de la descarboxilación de la lisina.

Lectura después de 8hr.	Lectura después de 24hr.	Interpretación.
Morado	Morado	Fermentación de glucosa(-) Descarboxilación(-)
Amarillo	Amarillo	Fermentación de glucosa(+) Descarboxilación(-)
Amarillo	Purpura turbio/Amarillo- purpura apagado.	Fermentación de glucosa(+) Descarboxilación(+)

Tabla 10. Resultados. Lectura de H₂S.

Precipitado negro.	H₂S.
Presencia de precipitado.	Positivo (+)
Sin precipitado.	Negativo (-)

Nota: es importante revisar el tubo a las 8 horas para poder apreciar el cambio de color en caso de que este ocurra.

La prueba de H₂S solo se puede leer en el medio fabricado por BIOXON o revisar el marbete del medio, para verificar que contenga la sal de Tiosulfato de Sodio.

8.5 TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI) ^{47,55}

Determinar la capacidad de un microorganismo para atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de desarrollo basal, con producción de gas o sin ella, junto con la determinación de ácido sulfhídrico.

8.5.1 Procedimiento

1. Con un asa bacteriológica, tomar una colonia aislada de 24hr, picar el medio hasta el fondo, y posteriormente estriar sobre la superficie del mismo.
2. Incubar el medio 24horas a 35± 0,5°C.
3. Los resultados de esta prueba deberán compararse con los resultados descritos en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Resultados. Lectura de TSI

Reacción.	Color.	Interpretación.
Alcalino/Acido	Rojo/Amarillo	Fermentación de glucosa (+). Fermentación de lactosa y/o sacarosa (-). Empleo aeróbico de las peptonas.
Acido/Acido	Amarillo/Amarillo	Fermentación de glucosa (+).

		Fermentación de lactosa y/o sacarosa (+).
Alcalino/Alcalino	Rojo/ Rojo	Fermentación de glucosa (-). Fermentación de lactosa y/o sacarosa (-). Empleo de las peptonas.
Sin cambio.	Anaranjado	Fermentación de glucosa (-). Fermentación de lactosa y/o sacarosa (-).

Continuación de la Tabla 11.

Tabla 12. Resultados. Lectura producción de Gas y de H₂S.

Precipitado negro.	H₂S.
Presencia de precipitado.	Positivo (+)
Sin precipitado.	Negativo (-)
Desplazamiento del medio.	Gas
Se observa desplazamiento.	Positivo (+)
Sin desplazamiento.	Negativo (-)

9.- OBLIGACIONES

9.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de A.E.A. están obligados a emplearla íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que en él se indica.

10.- RESPONSABILIDADES

10.1 Es responsabilidad del coordinador de Aseguramiento de la Calidad vigilar la correcta y completa aplicación de este procedimiento.

Es responsabilidad de los gerentes de área comunicar oportunamente al coordinador de Aseguramiento de la Calidad cualquier problema relacionado con la aplicación de este procedimiento para que tome las medidas necesarias para darle solución

11.- BIBLIOGRAFÍA.

11.1 MacFaddin F. Jean. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Panamericana 3th Ed Panamericana. México 2003 pc: 92 – 97, 113 – 127, 206 – 216, 223 – 235, 301- 305, 411 – 421.

11.2 Difco & BBL Manual. Manual of Microbiological Culture Media Second Edition 2009.Pag:324-326.

11.3 Londoño O. Amparo, Quintero M. María L., Hernández T. María G. Manual de microbiología general I, para QFB. U.N.A.M. 2005.Pag:46-73.

12.- ANEXO

Tabla 13. Identificación de microorganismos.

Pruebas bioquímicas.									
Cepa.	Indol	MR	VP	Citrato	Lisina/Desc	Ornitina/Desc	H ₂ S	Lactosa/Ferm	Móvil.
A	+	+	-	-	+	+/-	-	+	+
B	-	-	+	+	+	+	-	+	+
C	-	-	-	+	-	-	-	-	+
D	-	+	-	+/-	+	+	+	-	+

Microorganismo.

Cepa.

Escherichia coli

A

Enterobacter aerogenes

B

Pseudomonas aeruginosa

C

Salmonella typhimurium

D

PET TD-007-PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES NEFELOMÉTRICOS DE McFARLAND.		Vigencia
		Revisión
Elaboró	Firma	
Aprobó	Firma	
Autorizó.	Firma	

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	50
2. ALCANCE.....	51
3. ANTECEDENTES.....	51
4. DEFINICIONES.....	51
5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	51
6. REACTIVOS.....	52
7. MATERIAL Y EQUIPOS.....	52
8. PROCESO.....	53
9. OBLIGACIONES.....	54
10. RESPONSABILIDADES.....	54
11. BIBLIOGRAFIA.....	54

1.-OBJETIVO

1.1 Determinar la densidad bacteriana de un cultivo líquido de microorganismos y a partir de ahí obtener cultivos de una densidad conocida.

2.- ALCANCE

2.1 Este procedimiento deberá seguirse por todo el personal que labora en el área de bacteriología de A.E.A.

3.- ANTECEDENTES

3.1 La aplicación de este procedimiento en conjunto con el PET TD-008-Evaluación de medios de cultivo selectivos preparados en placa por la técnica de Miles and Misra, es necesaria para verificar las propiedades adecuadas de los medios empleados en el área.

4.-DEFINICIONES

4.1 Densidad bacteriana.- masa de microorganismos contenida en una solución, se expresa como UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro).⁵⁶

4.2 Cultivo.- un crecimiento de microorganismos.⁵⁷

4.3 Cultivo puro.- un cultivo que contiene el crecimiento de una única especie de microorganismo.⁵⁷

4.4 Nefelometría.- análisis cuantitativo para determinar la cantidad de partículas de una suspensión mediante la dispersión de la luz que pasa a través de la suspensión.⁵⁸

4.5 Nefelómetro.- instrumento similar a un colorímetro óptico, que utiliza el fenómeno Tyndall para medir la densidad de la concentración de sustancias en suspensión.⁵⁸

4.6 Tyndall, efecto.- un haz transversal de luz es reflejado o dispersado por partículas suspendidas en un gas o líquido.⁵⁹

4.7 Suspensión.- sistema que consiste en partículas pequeñas dispersas en un líquido; partículas que se depositan con lentitud en una posición.⁶⁰

4.8 Nefelómetro de McFarland.- instrumento similar a un colorímetro óptico, que utiliza el fenómeno Tyndall para medir la densidad de la concentración de una suspensión bacteriana. Estos patrones están designados por el número de los tubos de la escala descrita por McFarland.⁵⁹

4.9 Turbidimetría.- determinación del número de partículas finas suspendidas en un líquido por determinación del espesor del líquido que reduce la transmisión visual tanto como una solución estándar o un patrón estándar.⁶⁰

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

PET TD-008-Evaluación de medios de cultivo selectivos preparados en placa por la técnica de Miles and Misra.

6.- REACTIVOS

6.1 Cloruro de bario solución acuosa al 1%.

- Cloruro de bario R.A. (BaCl_2).....1g
- Agua destilada.....100ml.

Pesar con exactitud en la balanza granataria 1g de cloruro de bario (reactivo analítico) y disolver en 20 mL de agua destilada en un matraz aforado de 100mL, agitar hasta disolver. Aforar con agua destilada y mezclar.

Verter la solución en un frasco para reactivo, etiquetar y almacenar adecuadamente.

6.2 Ácido sulfúrico al 1%.

- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).....1mL
- Agua destilada.....99mL

Nota: los ácidos concentrados son extremadamente cáusticos, de modo que es necesario evitar la exposición de la piel ya que pueden producirse quemaduras dolorosas. Si ocurren salpicaduras, lavar la zona de inmediato con abundante agua.

Antes de trabajar con ácidos o álcalis concentrados, colocarse el equipo de protección personal indicado en la hoja de seguridad del reactivo y trabajar dentro de la campana.

En un matraz aforado de 100mL, agregar lentamente el ácido sulfúrico concentrado a un pequeño volumen de agua destilada. **No agregar agua al ácido.**

Lentamente aforar con agua destilada.

Verter la solución cuidadosamente en un frasco para reactivos de vidrio. Rotular con el nombre, concentración, fecha de preparación y nombre del analista que preparo la solución. Almacenar adecuadamente.

7.- MATERIAL Y EQUIPOS.

- 15 Tubos de vidrio de 16mm x 125mm con tapón de rosca.
- Pipetas graduadas de 1mL
- Gradilla
- Bulbo o perilla.
- Asa bacteriológica calibrada de 4mm
- Pipetas volumétricas de 1mL
- Matraces aforados de 100mL
- Frascos de vidrio para reactivos.
- Mechero Fisher
- Turbidímetro HACH 2100N
- Balanza granataria

8.- PROCESO⁶¹

Preparación de los estándares Nefelométricos.

8.1. Juntar 10 tubos con tapón de rosca (todos los tubos deben ser del mismo tamaño), deben estar perfectamente limpios y sin manchas o rayones.

Nota: el tamaño de los tubos debe ser el siguiente: 16mm x 125mm.

8.1.2. Rotular los tubos de manera adecuada con un marcador indeleble del uno al diez (1 – 10).

8.1.3. Adicionar los reactivos a los tubos, respetando las cantidades indicadas en la tabla 14.

Tabla 14. Estándares de sulfato de bario.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
BaCl ₂ al 1% (mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
H ₂ SO ₄ al 1% (mL)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Densidad Bact x 10 ⁸ /MI	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
Densidad Bact. en millones/mL	300	600	900	1.200	1.500	1.800	2.100	2.400	2.700	3.00

La reacción es la siguiente:



8.1.4 Sellar los tubos con parafilm.

8.1.5 El precipitado de BaSO₄ suspendido corresponde aproximadamente con la densidad de células por mililitro homogéneas del microorganismo evaluado.

8.2 La forma correcta de emplear los estándares preparados se describe a continuación:

8.2.1 Agitar con suavidad el tubo estándar seleccionado antes de realizar la comparación.

8.2.3 De manera aséptica (trabajando cerca del mechero), agregar una asada de un cultivo puro de 24hr del microorganismo a evaluar, en un tubo que contenga 5mL de Buffer de Fosfatos estéril de pH: 7.2; el tubo debe ser del mismo tamaño que los tubos estándar.

8.2.4 Si la suspensión bacteriana queda muy saturada, de manera aséptica, agregar lentamente un volumen de Buffer de fosfatos estéril de pH: 7.2, hasta que la turbidez se

iguale con el número deseado del tubo estándar. Realizar las lecturas en el turbidímetro hasta que ambas lecturas, la suspensión bacteriana y el estándar sean equiparables.

8.2.5 En caso de que la suspensión este por debajo de la turbidez del estándar, de manera aséptica, continuar inoculando el tubo con el cultivo de trabajo, teniendo cuidado de no saturar la suspensión. Realizar las lecturas en el turbidímetro hasta que ambas lecturas, la suspensión bacteriana y el estándar sean equiparables.

8.3 Medir la densidad del tubo a probar:

- 1) Cada tubo representa un múltiplo de 300,000,000 (millones) de microorganismos por mililitro, expresado en potencia: $10^8 = 100,000,000$.
- 2) La densidad bacteriana se obtiene de la siguiente manera:

$\text{N}^\circ \text{ del Tubo estándar} \times 300,000,000 = \text{No. de microorganismos/mL}$.

Ejemplo: para el tubo N°3

$3 \times 300,000,000 = 900,000,000$ microorganismos/mL o bien; 9×10^8 microorganismos/mL.

9.- OBLIGACIONES

9.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de A.E.A, están obligados a emplearlo íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que se indica.

10.- RESPONSABILIDADES

10.1 Es responsabilidad del gerente Técnico y de Desarrollo vigilar la correcta y completa aplicación de este procedimiento.

Es responsabilidad de los analistas comunicar oportunamente al gerente Técnico y de Desarrollo cualquier problema relacionado con la aplicación de este procedimiento para que tome las medidas necesarias para darle solución

11.- BIBLIOGRAFÍA

11.1 MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3th ed. Panamericana, México 2003. Pc: 764, 765, 808, 817, 822 y 823.

**PET TD-008-EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
SELECTIVOS PREPARADOS EN PLACA, POR LA TÉCNICA
MILES AND MISRA.**

Vigencia
Revisión

Elaboró Firma

Aprobó Firma

Autorizó. Firma

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	56
2. ALCANCE.....	56
3. ANTECEDENTES.....	56
4. DEFINICIONES.....	56
5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	56
6. REACTIVOS.....	56
7. MATERIAL Y EQUIPOS.....	57
8. PROCESO.....	57
9. OBLIGACIONES.....	60
10. RESPONSABILIDADES.....	60
11. BIBLIOGRAFIA.....	60
12. ANEXO.....	61

1.-OBJETIVO

1.1 Determinar la efectividad, sensibilidad y/o especificidad de los medios de cultivo selectivos preparados en placa, realizando diluciones decimales seriadas a partir de una suspensión bacteriana ajustada al tubo número 5 del nefelómetro de McFarland; para verificar la idoneidad de cada lote de medios de cultivo selectivos recibidos en el laboratorio.

2.- ALCANCE

2.1 Este procedimiento deberá realizarse a cada lote nuevo de medios de cultivo selectivos que lleguen al área de Bacteriología, antes de ser empleados por el personal de A.E.A.

3.- ANTECEDENTES

3.1 En el campo de la microbiología deben existir y/o establecerse normas y requisitos de calidad para garantizar la eficiencia de los medios de cultivo; deben controlarse por lo tanto no solo los métodos empleados en los estudios microbiológicos, sino también la elaboración y preparación correcta de los mismos.

Por lo tanto es importante mantener un sistema de control de calidad enfocado a los medios de cultivo empleados en el área, con la finalidad de asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos con estos medios de cultivo así como en las pruebas bioquímicas.⁴⁹

4.-DEFINICIONES

4.1 Medio de cultivo.- es el material nutritivo en el que se pueden recuperar, multiplicar y aislar los microorganismos.⁶²

4.2 Diluciones decimales.- las suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la dilución primaria con un volumen de nueve veces un diluyente y que por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.⁶³

4.3 Nefelómetro de McFarland.- instrumento similar a un colorímetro óptico, que utiliza el fenómeno Tyndall para medir la densidad de la concentración de una suspensión bacteriana. Estos patrones están designados por el número de los tubos de la escala descrita por McFarland.⁵⁹

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

5.1 PET TD-Preparación de material estéril para bacteriología.

5.2PET TD-007Preparación de los estándares nefelométricos de McFarland.

6.- REACTIVOS.

6.1 Buffer de fosfatos estéril pH: 7.2⁶⁴

- Fosfato monobásico de potasio.....34g
- Agua destilada.....1000mL

Preparar la solución en un matraz aforado de 1L; disolver los 34g de fosfato monobásico de potasio en 500mL de agua destilada, llevar a 1L con agua destilada y ajustar el pH a 7.2 ± 0.1 agregando Hidróxido de Sodio 0.1N.

Una vez lista la solución, verter en frascos para reactivos y esterilizar. Finalmente etiquetarlo de forma adecuada, y almacenar en refrigeración.

6.2 Hidróxido de Sodio 0.1N⁶⁵

- Hidróxido de sodio R.A (NaOH).....4g
- Agua destilada.....1000mL

Pesar con rapidez NaOH y disolver en menos de 100mL de agua destilada en un vaso de precipitado. Este reactivo es altamente higroscópico; evitar la exposición al aire no más de lo necesario. Colocar el vaso de precipitado en baño de agua para controlar la temperatura, esta reacción es muy exotérmica.

Enfriar la solución y transferirla a un matraz aforado de 1L y aforar con agua destilada. Verter la solución en frascos para reactivo, etiquetarla y almacenarla de forma adecuada.

7. MATERIAL Y EQUIPOS

- Cepas de referencia
- Tubos de vidrio de 16mm x 125mm con tapón de rosca.
- Cajas de Petri de 90 x 15.
- Gradilla
- Asa microbiológica calibrada de 4mm.
- Mechero Fisher
- Incubadora Rios- Rocha a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$
- Olla de presión marca All American
- Potenciómetro Corning 250
- Turbidímetro HACH 2100N
- Contador de colonias
- Balanza granataria

8.- PROCESO⁶⁶

8.1 De un lote nuevo del medio de cultivo a evaluar, hacer los cálculos necesarios y preparar una cantidad suficiente para realizar la prueba.

Nota: para esta prueba emplear placas Petri de 90 x 15.

8.2 Partiendo de un cultivo de 24 hr. (Empleando cepas de referencia), preparar una

suspensión bacteriana (A) en 5mL de buffer de fosfatos estéril de pH: 7.2 (Buffer), e igualarla con el tubo número 5 del nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 UFC/ml aprox.); haciendo la lectura de dichas suspensiones en el turbidímetro, hasta que las lecturas sean equiparables.

De esta forma, preparar las suspensiones de todos los microorganismos que serán empleados en el análisis.

8.3 De la suspensión bacteriana (A), tomar 0.5mL y adicionarlos a un tubo que contenga 4.5mL del Buffer (dilución 10^{-1}). De este tubo tomar 0.5mL y adicionarlos a otro tubo que contenga 4.5mL del Buffer (dilución 10^{-2}). De esta forma realizar diluciones seriadas hasta obtener una dilución de 10^{-8} (ver tabla 1).

Nota: realizar suspensiones bacterianas de los microorganismos que sean necesarios.

8.4 Dividir con un plumón indeleble, la parte posterior de la placa del medio a evaluar en cuatro cuadrantes, y marcar cada cuadrante con el nombre del microorganismo correspondiente; es conveniente emplear microorganismos que nos permitan evaluar todas las propiedades del medio como son: recuperación (que presente buen crecimiento), propiedades bioquímicas (modificación de las características del medio debido a su metabolismo) e inhibición de crecimiento (cuyo crecimiento sea inhibido por el medio).

8.5 Con un asa bacteriológica calibrada de 4mm (0.01mL), tomar un inóculo de la dilución 10^{-5} de cada suspensión bacteriana (A, B, o C según sea el caso) e inocular el cuadrante correspondiente, dejando el último cuadrante sin inocular para evaluar la esterilidad del medio.

Nota: las diluciones subsecuentes (-6, -7 y -8) se almacenan en refrigeración, de forma preventiva en caso de que el inóculo haya sido muy cargado y sea imposible realizar una cuenta adecuada.

8.6 Sembrar de forma masiva, cuidando no salirse del cuadrante. Incubar el medio 24 horas a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (ver figura 1).

8.7 A la par de la prueba, realizar la cuenta viable para cada microorganismo utilizado el medio Agar extracto glucosa y tripticaseina (Agar extracto); de la misma forma que se realizó la inoculación del medio evaluado; dividir una placa de agar extracto en cuatro cuadrantes y con un asa calibrada de 4mm (0.01mL), tomar el inóculo de la dilución 10^{-5} de cada suspensión bacteriana (A, B, C) e inocular el cuadrante correspondiente.

8.8 Sembrar de forma masiva, cuidando no salirse del cuadrante. Incubar el medio 24 horas a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (ver figura 1).

8.9 Realizar cada análisis por duplicado para cada lote de medio de cultivo evaluado.

Tabla 15. Diluciones seriadas partiendo de suspensión bacteriana (A).

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
UFC/mL	15×10^7	15×10^6	15×10^5	15×10^4	15×10^3	15×10^2	15×10	15
mL de Buffer	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Inoculo	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
UFC (aprox.)	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	1500	150	15

8.10 Cálculos.

8.10.1 Después del periodo de incubación se realiza un conteo de las UFC recuperadas en el medio evaluado; y a la par se realiza el conteo de las UFC en el medio agar extracto (cuenta viable).

8.10.11 Para obtener el porcentaje de recuperación del medio se realizan los siguientes cálculos:

$$\frac{\text{UFC recuperadas en el medio evaluado}}{\text{UFC cuenta viable}} \times (100) = \% \text{ de recuperación.}$$

Nota: el porcentaje de recuperación debe estar entre el 75 – 120 % para medios selectivos.

8.11 Resultados.

8.11.1 Un resultado satisfactorio se considera cuando el porcentaje de recuperación obtenido, se encuentra dentro del intervalo de 75 – 120 % , para el microorganismo(s) indicado y se cumplen las especificaciones señaladas por el fabricante como; pH final, la parcial o total inhibición de los microorganismos indicados, así como las características físicas del medio.

8.11.2 Si se cumple lo anterior, los resultados son registrados en la bitácora correspondiente y el lote se acepta para ser utilizado.

8.11.3 Si los resultados no cumplen con las especificaciones señaladas, se realizará un segundo análisis para verificar los resultados obtenidos.

8.11.4 Si los resultados obtenidos son satisfactorios, se registran en la bitácora correspondiente y el lote se acepta para ser utilizado. En caso de obtener nuevamente resultados que no cumplan con la especificación señalada por el fabricante, se registran en la bitácora correspondiente y el lote se rechaza.

9.- OBLIGACIONES

9.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de A.E.A. están obligados a emplearlo íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que en él se indica.

10.- RESPONSABILIDADES

10.1 Es responsabilidad del gerente Técnico y de Desarrollo vigilar la correcta y completa aplicación de este procedimiento.

Es responsabilidad de los analistas comunicar oportunamente al gerente Técnico y de Desarrollo cualquier problema relacionado con la aplicación de este procedimiento para que tome las medidas necesarias para darle solución

11.- BIBLIOGRAFÍA

11.1 MacFaddin F. Jean. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Panamericana 3^oed. México 200

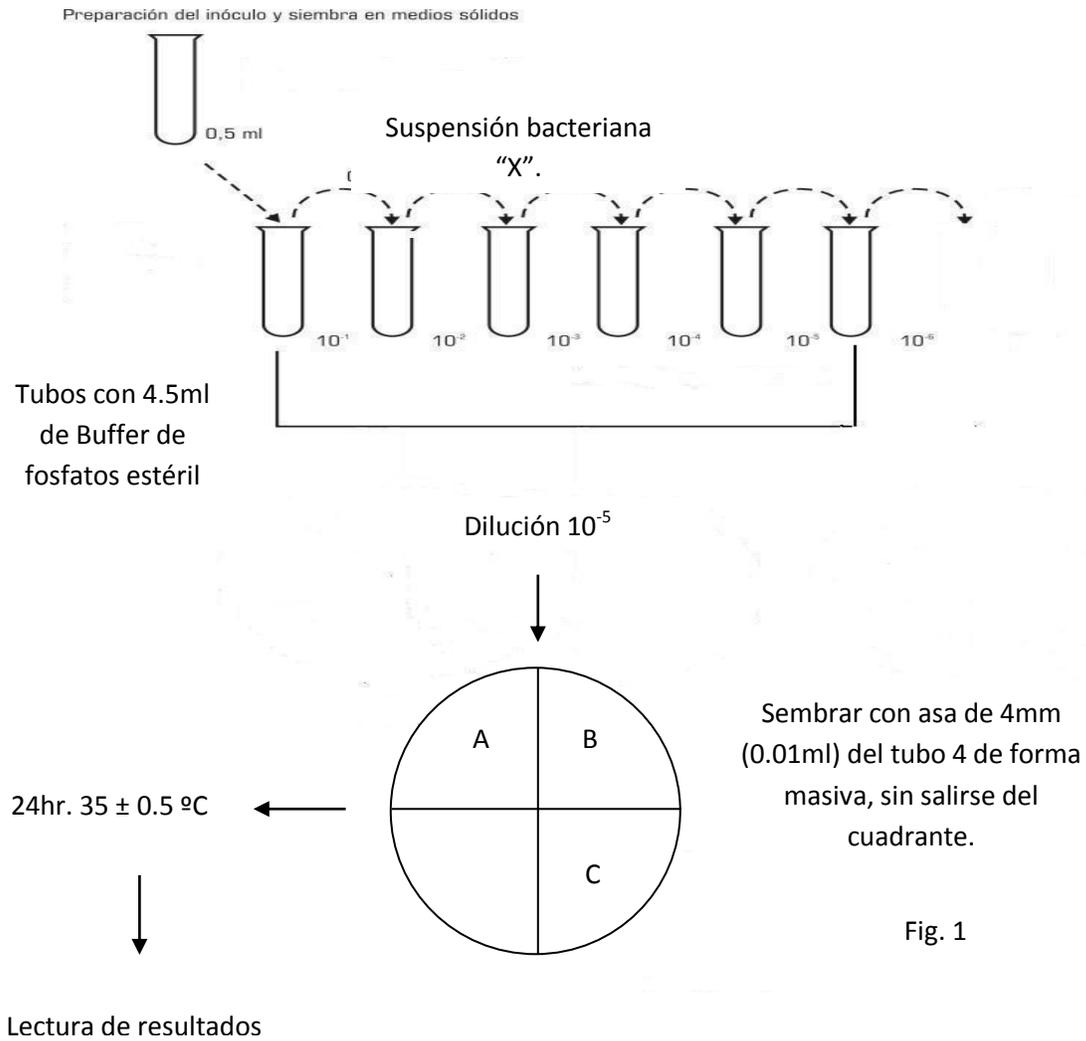
11.2 Lic. Zulia Weng Alemán, et all. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Revista Cubana Higiene y Epid 2004; 42(1)

11.3 USP 31 NF 2008 <61>

11.4 Miles, A.A. Y Misra, S.S. 1938. The stimation of the bacterial power of the blood. J. Hyg.38:732 – 749.

12.- ANEXO

Diagrama 1.



**PET TD-009-EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO
LÍQUIDOS Y PREPARADOS EN PLACA.**

Vigencia
Revisión

Elaboró Firma

Aprobó Firma

Autorizó. Firma

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	63
2. ALCANCE.....	63
3. ANTECEDENTES.....	63
4. DEFINICIONES.....	63
5. FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS.....	63
6. REACTIVOS.....	63
7. MATERIAL Y EQUIPOS.....	64
8. PROCESO.....	64
9. OBLIGACIONES.....	66
10. RESPONSABILIDADES.....	66
11. BIBLIOGRAFIA.....	67
12. ANEXO.....	68

1.-OBJETIVO

1.1 Verificar las propiedades de los medios de cultivo líquidos y preparados en placa, empleados el área de Bacteriología mediante pruebas simples y rápidas, para asegurar que cumplan con los requerimientos nutricionales para el desarrollo y recuperación de los microorganismos estudiados en el área.

2.- ALCANCE

2.1 Este procedimiento deberá realizarse a cada lote nuevo de medios de cultivo líquidos y semisólidos preparados en placa que lleguen al área de Bacteriología, antes de ser empleados por el personal de A.E.A.

3.- ANTECEDENTES

3.1 En el campo de la microbiología deben existir y/o establecerse normas y requisitos de calidad para garantizar la eficiencia de los medios de cultivo; deben controlarse por lo tanto no solo los métodos empleados en los estudios microbiológicos, sino también la elaboración y preparación correcta de los mismos.

Por lo tanto es importante mantener un sistema de control de calidad enfocado a los medios de cultivo empleados en el área, con la finalidad de asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos en estos medios de cultivo así como en las pruebas bioquímicas.⁴⁹

4.-DEFINICIONES

4.1 Medio de cultivo.- es el material nutritivo en el que se pueden recuperar, multiplicar y aislar los microorganismos⁶²

4.2 Diluciones decimales seriadas.- las suspensiones o soluciones obtenidas al mezclar un determinado volumen de la dilución primaria con un volumen de nueve veces un diluyente y que por repetición de esta operación con cada dilución así preparada, se obtiene la serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación de medios de cultivo.⁶³

4.3 Nefelómetro de McFarland.- es una serie de patrones, de turbidez diferente, que permite realizar una estimación de la densidad de las suspensiones bacterianas. Estos patrones están designados por el número de los tubos de la escala descrita por McFarland.⁵⁹

5.- FORMATOS Y PROCEDIMIENTOS COMPLEMENTARIOS

5.1 PET TD-Preparación de material estéril para bacteriología.

5.2 PET TD-007 Preparación del Nefelómetro de MacFarland.

6.- REACTIVOS.

6.1 Buffer de fosfatos estéril pH: 7.2⁶⁴

- Fosfato monobásico de Potasio.....34g

- Agua destilada.....1000mL

Preparar la solución en un matraz aforado de 1L; disolver los 34g de fosfato monobásico de Potasio en 500mL de agua destilada, aforar a 1L con agua destilada y ajustar el pH a 7.2 ± 0.1 agregando hidróxido de Sodio 0.1N.

Una vez lista la solución, verter en frascos para reactivos y esterilizar. Finalmente etiquetarlo de forma adecuada, y almacenar en refrigeración.

6.2 Hidróxido de Sodio 0.1N⁶⁵

- Hidróxido de Sodio R.A (NaOH).....4g
- Agua destilada.....1000mL

Pesar con rapidez NaOH y disolver en menos de 100mL de agua destilada en un vaso de precipitado. Este reactivo es altamente higroscópico; evitar la exposición al aire no más de lo necesario. Colocar el vaso de precipitado en baño de agua para controlar la temperatura, esta reacción es muy exotérmica.

Enfriar la solución y transferirla a un matraz aforado de 1L y aforar con agua destilada. Verter la solución en frascos para reactivo, etiquetarla y almacenarla de forma adecuada.

7. MATERIAL Y EQUIPOS

- Cepas de referencia
- Tubos de vidrio de 16mm x 125mm con tapón de rosca.
- Cajas de Petri de 90 x 15.
- Gradillas
- Asa microbiológica calibrada de 4mm (0.01mL).
- Mechero Fisher
- Incubadora Rios- Rocha a $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$
- Olla de presión marca All American
- Potenciómetro Corning 250
- Turbidímetro HACH 2100N
- Contador de colonias
- Balanza granataria

8.- PROCESO⁶⁶

8.1 Del lote nuevo del medio de cultivo a evaluar, hacer los cálculos necesarios y preparar una cantidad suficiente para realizar la prueba. Nota: para esta prueba emplear placas Petri de 90 x 15.

8.2 Partiendo de un cultivo de 24 hr (empleando cepas de referencia), preparar una suspensión bacteriana (A) en 5mL de buffer de fosfatos estéril de pH: 7.2 (Buffer), e igualarla con el tubo número 5 del nefelómetro de McFarland (15×10^8 UFC/ml aprox); haciendo la lectura de dichas suspensiones en el turbidímetro, hasta que las lecturas sean equiparables.

De esta forma, preparar las suspensiones de todos los microorganismos que serán empleados en el análisis.

8.3 De la suspensión bacteriana (A), tomar 0.5mL y adicionarlos a un tubo que contenga 4.5mL del Buffer (dilución 10^{-1}). De este tubo tomar 0.5mL y adicionarlos a otro tubo que contenga 4.5mL del Buffer (dilución 10^{-2}). De esta forma realizar diluciones seriadas hasta obtener una dilución de 10^{-8} (ver tabla 1).

8.4 Marcar con un plumón indeleble, la parte posterior de la placa del medio(s) a evaluar, con el nombre del microorganismo correspondiente.

8.5 Con un asa bacteriológica calibrada de 4mm (0.01mL), tomar un inóculo de la dilución 10^{-5} de cada suspensión bacteriana (A, B, C) e inocular la parte central de la placa del medio correspondiente.

8.6 Sembrar de forma masiva e incubar el medio 24 horas a $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (ver figura 1); incubar al mismo tiempo una placa sin inocular para verificar la esterilidad del medio.

8.7 Realizar el análisis por duplicado para cada lote de medio de cultivo evaluado.

Tabla 16. Diluciones seriadas partiendo de suspensión bacteriana (A).

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8
Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
UFC/mL	15×10^7	15×10^6	15×10^5	15×10^4	15×10^3	15×10^2	15×10^1	15
mL de Buffer	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
Inóculo	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
UFC (aprox.)	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	Incontables	150	15

8.8 Resultados.

8.8.1 Para medios de cultivo no selectivos, es suficiente con observar el crecimiento característico acompañado de la morfología colonial típica del microorganismo evaluado. Por otro lado, al trabajar con un inóculo estandarizado, el crecimiento obtenido no debe diferir en un factor mayor de 8 UFC entre la muestra y su duplicado.

8.8.2 Un resultado se considera satisfactorio cuando: se obtiene crecimiento del microorganismo(s) indicado por el fabricante, y se cumplen con las especificaciones como pH final y las propiedades físicas del medio.

8.8.3 Si se cumple lo anterior, los resultados se registran en la bitácora correspondiente y se acepta el lote para ser utilizado.

8.8.4 Si los resultados obtenidos no cumplen con la especificación señalada por el fabricante, se realizará un segundo análisis para verificar los resultados obtenidos.

8.8.5 Si los resultados obtenidos cumplen con la especificación señalada, se registran en la bitácora correspondiente, y el lote es aceptado. En caso de obtener nuevamente resultados fuera de especificación, se registran en la bitácora correspondiente y el lote se rechaza.

8.9 Medios de cultivo líquidos.

8.9.1. De un lote nuevo del medio de cultivo a evaluar, hacer los cálculos necesarios y preparar una cantidad suficiente para realizar la prueba.

8.9.2 Partiendo de un cultivo de 24 hr. (Empleando cepas de referencia), tomar una asada de 1 o 2 colonias aisladas, e inocular el medio de cultivo a evaluar.

8.9.3 Incubar a la temperatura y durante el tiempo indicado por el fabricante; incubar a la par un tubo con el medio sin inocular para verificar la esterilidad del medio.

8.9.4 Resultados

8.9.4.1 Un resultado satisfactorio se considera cuando: el crecimiento del microorganismo(s) indicado por el fabricante es claramente visible (por la turbidez presente en el tubo) y el valor del pH final, cumple con las especificaciones del fabricante.

8.9.4.2 Si se cumple con lo anterior, los resultados se registran en la bitácora correspondiente y el lote es aceptado para ser utilizado.

8.9.4.3 En caso de no cumplir con las especificaciones señaladas, se realizará otro análisis para verificar los resultados obtenidos. Si los resultados del análisis continúan sin cumplir con las especificaciones señaladas, el lote será rechazado.

9.- OBLIGACIONES

9.1 Siempre que este procedimiento sea aplicable, los miembros de A.E.A, están obligados a emplearlo íntegramente, apegándose de manera rigurosa a lo que en él se indica.

10.- RESPONSABILIDADES

10.1 Es responsabilidad del gerente Técnico y de Desarrollo vigilar la correcta y completa aplicación de este procedimiento.

Es responsabilidad de los analistas comunicar oportunamente al gerente Técnico y de Desarrollo cualquier problema relacionado con la aplicación de este procedimiento para que tome las medidas necesarias para darle solución

11.- BIBLIOGRAFÍA

11.1 MacFaddin F. Jean. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Panamericana 3°ed. México 200

11.2 Lic. Zulia Weng Alemán, et all. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Revista Cubana Higiene y Epid 2004; 42(1)

11.4 USP 31 NF 2008 <61> y <62>

11.5 Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. DifcoTM and BBLTM Manual of Microbiological Culture Media. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009. Pc: 16

12. Miles, A.A. and Misra, S.S. 1938. The estimation of the bacterial power of the blood. J. Hyg.38:732 – 749.

12.- ANEXO

Diagrama 1.

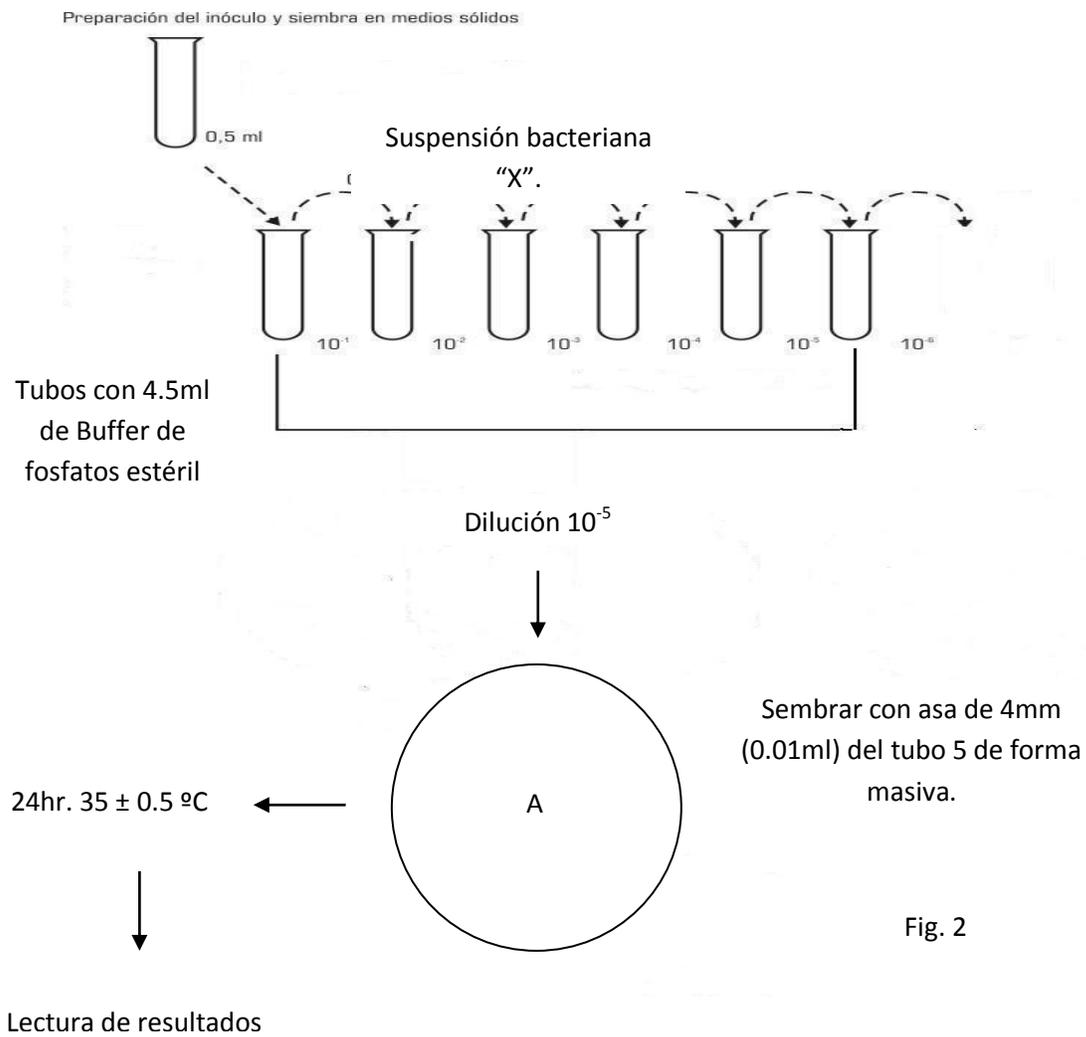


Fig. 2

Análisis de Resultados.

Antes de implementar el “Plan de calidad para el área de bacteriología”, el laboratorio A.E.A, recibió la visita de la Entidad Mexicana de Acreditación (E.M.A) a finales del año 2011, para realizar una Evaluación de vigilancia y actualización de normas y métodos.

Al final de la visita se le entregó al laboratorio, un Informe de Evaluación; en el apartado de hallazgos, se asentaron cuatro no conformidades que afectaron al área de Bacteriología, de las cuales tres eran de tipo B y una de tipo A. Estas no conformidades estaban directamente relacionadas con las normas mexicanas: NMX-AA-042-1987 Calidad del agua – Determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva análisis de aguas- y NMX-AA-102-1987 Detección y enumeración de organismos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* presuntiva – Método de filtración de membrana.

Considerando la importancia de los hallazgos encontrados, se realizó la implementación del “Plan de Calidad para el área de bacteriología” como acción correctiva.

A mediados del año 2012 el laboratorio A.E.A. recibió la segunda visita por parte de la E.M.A., para darle seguimiento a los hallazgos encontrados en su última visita.

Durante la visita, el Coordinador de Aseguramiento de Calidad, le indicó al equipo auditor que la acción correctiva tomada para cerrar las no conformidades concernientes al área de Bacteriología, fue la “Implementación del Plan de Calidad para el área de Bacteriología”, y se mostró como evidencia objetiva y verificable, los procedimientos descritos en este trabajo de Tesis.

Como resultado de la visita de seguimiento de acciones correctivas realizada por la E.M.A. donde se verificó la implementación del “Plan de Calidad para el área de Bacteriología”, las no conformidades levantadas durante la primera visita, fueron cerradas en tiempo y forma.

Conclusiones.

La implementación efectiva del “Plan de Calidad para el área de Bacteriología”, así como los procedimientos complementarios descritos en este trabajo de Tesis, cumplieron con el objetivo establecido en un principio:

Mejorar el control de Calidad en el área de Bacteriología, implementando un plan de calidad, para complementar los requisitos generales en la acreditación de los laboratorios de ensayo, establecidos en la Norma Mexicana NMX-EC-17025 vigente; y de esta forma tener la certeza de que los resultados obtenidos son seguros, confiables y de alta calidad, garantizando que el proceso analítico utilizado es exacto, confiable y adecuado para el propósito aplicado.

Bibliografía.

- <http://www.atcc.org>
- <http://www.ema.org.mx/ema/ema/index.php>
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 2011 Vol. II. Pc: 2599 – 2600.
- Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002.
- Manual para el manejo de residuos peligrosos y bioseguridad. Aseguramiento de la calidad 2000 Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica pc: 5,20,25, 26,32,36.
- Manual de Reactivos Merck 1987.
- Zimbro, B.S. Mary Jo, et. All. Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.
- NMX-EC-17025-IMNC-2006 Norma Mexicana IMNC Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- Norma Mexicana Sistemas de gestión de la calidad – Fundamentos y vocabulario. NMX-CC-9000-IMNC-2008.
- Norma Oficial Mexicana: NOM-001-SEMARNAT-Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano – Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”.
- Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades.
- Norma Mexicana NMX-AA-042-1987 Calidad del agua – Determinación del número más Probable (NMP) de Coliformes Totales, Coliformes Fecales (Termotolerantes) y *Escherichia coli* Presuntiva Wather Quality – Determination of the Most Probable Number (NMP) of Total Coliforms, Fecal Coliforms (Termal Tolerants), and *Escherichia coli* Presumptive.

- Norma Mexicana NMX-AA-102-2006 Calidad del agua – Determinación Enumeración de Coliformes, Organismos Coliformes Termotolerantes y *Escherichia coli* Presuntiva – Método de Filtración en Membrana. Water Quality – Determination of Coliform Bodies, Coliform Termal Tolerants Bodies and *Escherichia coli* Presumptive – Method of Filtration in Membrane.
- Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal-Selección, uso y manejo en los centros de trabajo.
- <http://www.who.int/es/>
- PROY-NMX-AA-042-SCFI-2005 Calidad del agua.-Determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales, coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva (cancelará a la NMX-AA-042-1987).
- PROY-NMX-CC-19011-IMNC-2011. Directrices para las auditorias de los sistemas de gestión. Guidelnes for auditing management systems.
- Procedimiento Estándar de Trabajo: TD-222 Detección y enumeración de organismos coliformes y organismos coliformes termotolerantes en agua potable y natural por el método de filtración en membrana.
- Procedimiento Estándar de Trabajo: TD-333 Determinación de coliformes totales y coliformes fecales (termotolerantes) en agua natural y residual por el método del número más probable (NMP).
- MacFaddin F. Jean. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Ed. Panamericano 3 ° ed. México 2004 pc: 92-98, 113-128, 192-206, 206-217, 223-236, 301-306, 306-312, 411-422. Apéndice 1: 747,750, 751, 752, 753, 756; Apéndice 4: 761-763; Apéndice 5; 12.
- Serie sobre Principios de Buenas prácticas de laboratorio y verificación de su conformidad. Número 1. Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio de la OCDE. París 1998.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater APHA, AWWA, WPCF, 19th ed. 1995 pc: 9:5, 9:17, 9:27, 9:79, 9:93.

Artículos relacionados.

Blanca Jiménez C., Marisa Mazari H., Ramón Domínguez M. y Enrique Cifuentes G. 2004. El agua en el valle de México. Pc: 15-32.

Barrera Escorcía Guadalupe, Namihira Santillán Patricia Esperanza. 2004. Contaminación microbiológica en la zona de Akumal, Quintana Roo México. Hidrobiológica, Junio, vol. 14, número 001 Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa D.F México pc: 27-35.

Lic. Zulia Weng Alemán, et all. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Revista Cubana de Higiene y Epid 2004; 42(1).

Miles, A.A. and Misra, S.S. 1938. The stimation of the bacterial power of the blood. J. Hyg.38:732 – 749.

Javier Sánchez-Pérez, Héctor PhD. D. Vargas-Morales María Guadalupe, Q.F.B. Méndez-Sánchez José Domingo, Q.F.B. Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. Salud pública de México / vol.42, no.5, septiembre-octubre de 2000. Pc: 397-406.

ANEXO I. Vocabulario.

Acreditación: es el reconocimiento formal y público, por un organismo imparcial y de tercera parte, en el caso de México es la Entidad Mexicana de Acreditación, a.c (E.M.A), de la competencia técnica y confiabilidad de un laboratorio para proporcionar los servicios, en este caso del análisis de una muestra representativa de un universo, y como resultado de su actividad emiten un informe de resultados, a través de evaluar su cumplimiento con los requisitos establecidos en la Norma Mexicana NMX-EC-17025 (2006).

Auditoría: es el proceso sistemático, independiente y documentado para obtener evidencias de la auditoría y evaluarlas de manera objetiva con el fin de determinar el grado en que se cumplen los criterios de auditoría.

Acción preventiva: acción tomada para eliminar la causa de una no conformidad potencial u otra situación potencial no deseable.

Acción correctiva: acción tomada para eliminar la causa de una no conformidad detectada u otra situación no deseable.

Buenas Prácticas de Laboratorio: constituyen un sistema de garantía de calidad relativo al modo de organización de los estudios de seguridad no clínicos referentes a la salud y al medio ambiente y, asimismo, acerca de las condiciones en que estos estudios se planifican, se ejecutan, se controlan, se registran, se archivan y se difunden.

Calidad: grado en el que un conjunto de características inherentes, cumplen con los requisitos.

Calibración: conjunto de operaciones que establece, bajo condiciones específicas, la relación entre las señales producidas por un instrumento analítico y los correspondientes valores de concentración o masa del juego de patrones de calibrado.

Característica: rasgo diferenciador.

Certificación: es la confirmación de que una organización ha establecido un sistema de gestión de la calidad conforme con ciertos requisitos, los cuales en su mayoría están enfocados a la gestión de la calidad y no a la parte técnica.

Contaminación: Inclusión en el medio ambiente o en los animales, de microorganismos o sustancias nocivas que alteran el equilibrio ecológico, provocando trastornos en el medio físico y en los organismos vivos o el hombre.

Control de calidad: parte de la gestión de la calidad orientada al cumplimiento de los requisitos de calidad.

Criterios de auditoria: conjunto de políticas, procedimientos o requisitos usados como referencia frente a la cual se compara la evidencia de auditoría.

Documento: información y su medio de transporte.

E. coli: Bacilo Gram negativo , aerobio o anaerobio facultativo no esporulado que se caracteriza por poseer la enzima beta- galactosidasa , se desarrolla a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, fermenta la lactosa y el manitol produciendo ácido y gas , produce indol a partir del triptófano, es oxidasa negativo y no hidroliza la urea.

Ensayo: determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

Esterilización: proceso químico o físico para matar todos los organismos vivos.

Evidencia objetiva: datos que respaldan la existencia o veracidad de algo.

Evidencias de auditoria: registros, declaraciones de hechos o cualquier otra información que es pertinente para los criterios de auditoría y que es verificable.

Filtro de membrana: Técnica que se utiliza para determinar la cantidad de organismos presentes en un volumen de muestra determinado.

Información: datos que poseen significado.

Limpieza: acción mediante la cual se remueve la suciedad de una superficie.

Manual de calidad: documento que especifica el sistema de gestión de la calidad de una organización.

Medio de cultivo: es el material nutritivo en el que se pueden recuperar, multiplicar y aislar los microorganismos, así como efectuar pruebas de susceptibilidad.

Mejora continua: es incrementar la probabilidad de aumentar la satisfacción de los clientes y otras partes interesadas.

No conformidades: incumplimiento de un requisito; pueden ser

- Crítica.- es la ausencia o no aplicación en su totalidad de un elemento del sistema en toda la empresa.
- Mayor.- es la ausencia o no aplicación de parte de un elemento del sistema en toda la empresa o de todo el elemento en un departamento de la empresa.
- Menor.- es el incumplimiento puntual de parte de un elemento del sistema.

Número más probable: Expresión estadística que se utiliza para estimar la cantidad de bacterias coliformes presentes en un volumen de muestra determinado.

Organismos coliformes: Comprende todos los bacilos aerobios o anaerobios facultativos Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa a 35°C a 37°C con producción de gas y ácido en un periodo de 24 h a 48 h.

Organismos coliformes fecales (termotolerantes): Comprende todos los bacilos aerobios o anaerobios facultativos, Gram negativos, no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 44°C ± 1°C en un plazo de 24 h.

Planificación de la calidad: parte de la gestión de la calidad enfocada al establecimiento de los objetivos de calidad y a la especificación de los procesos operativos necesarios y de los recursos necesarios para cumplir los objetivos de calidad.

Plan de calidad: documento que especifica que procedimientos y recursos asociados deben aplicarse, quien debe aplicarlos, y cuando deben aplicarse a un proyecto, producto, proceso o contrato específico.

Proceso: se define como un conjunto de actividades mutuamente relacionadas o que interactúan, las cuales transforman elementos de entrada en resultados.

Procedimiento: forma especializada para llevar a cabo una actividad o proceso.

Requisito: necesidad o expectativa establecida, generalmente implícita u obligatoria.

Seguridad de funcionamiento: conjunto de propiedades utilizadas para describir la disponibilidad y los factores que la influyen; confiabilidad, capacidad de mantenimiento y soporte.

Sistema de gestión de la calidad: sistemas de la calidad, administrativos y técnicos, que rigen las actividades de un laboratorio.

Verificación: confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.

ANEXO II. Lista de Abreviaturas.

1. AEA.: Siglas del laboratorio donde se realizó la implementación del Plan de Calidad.
2. AC: Aseguramiento de Calidad.
3. AEG: Agar Extracto Glucosa.
4. ATCC: American Type Culture Collection.
5. Caldo E.C: Caldo *Escherichia coli*.
6. CI: Control Interno.
7. CNA: Comisión Nacional del Agua.
8. CN: Caldo Nutritivo.
9. Col. Totales: Coliformes Totales.
10. Col. Fecales: Coliformes fecales.
11. CV: Coeficiente de variación.
12. CST: Caldo Soya Trypticaseína.
13. D: Duplicado.
14. EMA: Entidad Mexicana de Acreditación.
15. FAC: Formato de Aseguramiento de Calidad.
16. FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
17. FM: Filtro en membrana.
18. IMViC: Abreviatura para las pruebas bioquímicas Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato.
19. INE: Instituto Nacional de Ecología.
20. LIA: Agar Hierro Lisina.
21. Log: Logaritmo.
22. MF: Microfiltración.
23. mL: Mililitro.
24. MIO: Motilidad Indol Ornitina.
25. NMP: Número Más Probable.
26. n: Número de muestras.
27. PET: Procedimiento Estándar de Trabajo.
28. R: Rango.
29. RA: Reactivo Analítico.
30. SDA: Agar Dextrosa Saboraud.
31. TD: Departamento Técnico.
32. TSI: Triple Azúcar Hierro.
33. UFC: Unidad Formadora de Colonias.
34. USP: United States Pharmacopea.

ANEXO III. Referencias.

- 1.- <http://www.ema.org.mx/portal/>
- 2.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Anexo I.
- 3.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Control de calidad interno. Pag.:17.
- 4.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Control de calidad externo. Pag.:17.
- 5.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Personal. Pag.:4.
- 6.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Condiciones ambientales. Pag.:5-7.
- 7.-Manual para el manejo de residuos peligrosos y Bioseguridad. InDRE SSA México 2000. Pag.:25
- 8.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Equipos: Mantenimiento, calibración y verificación de su funcionamiento, Pag.:9-13.
- 9.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Reactivos y medios de cultivo. Pag.:13-14.
- 10.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Materiales de referencia y Cepas de referencia. Pag.15.
- 11.-Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Vol.II. 35ªed. 2011 Apéndice V. Pc: 2599-2600.
- 12.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Muestreo. Pag.:15-16.

- 13.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Eliminación de residuos contaminados. Pag.:17.
- 14.-Manual para el manejo de residuos peligrosos y Bioseguridad. InDRE SSA México 2000. Pag.:20-34.
- 15.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Aseguramiento de la Calidad de los resultados/Control de Calidad. Pag.: 17-18.
- 16.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Informes de los ensayos. Pag.:18.
- 17.-Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Condiciones ambientales. Pag.:5-7.
- 18.-Lic. Zulia Weng Alemán, et all. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). Revista Cubana de Higiene y Epid 2004; 42(1).
- 19.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag: 21-22.
- 20.-Manual de Reactivos Merck 1987.Pag:1.
- 21.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag:22.
- 22.-Manual de Reactivos Merck 1987.Pag:2.
- 23.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag:23.
- 24.-Manual de Reactivos Merck 1987.Pag:3.
- 25.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag: 13-15.
- 26.- Manual de Reactivos Merck 1987.Pag:4.
- 27.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag:23.

- 28.-Manual de Reactivos Merck 1987.Pag:4.
- 29.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. *Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media*. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag:23.
- 30.- Manual de Reactivos Merck 1987.Pag:7.
- 31.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. *Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media*. 2thed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag:24.
- 32.-Tesis. “Manual de Prácticas para la asignación de Microbiología Farmacéutica”. Jessica Ramirez León. FESC; 2005.Pag.:75-95.
- 33.- Stándar Methods for the Examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 19th ed. 1995.
- 34.- Stándar Methods for the Examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 19th ed. 1995.
- 35.- Stándar Methods for the Examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 19th ed. 1995.
- 36.- Stándar Methods for the Examination of water and wastewater. APHA, AWWA, WEF. 19th ed. 1995.
- 37.-Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal-Selección, uso y manejo en los centros de trabajo.
- 38.-MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3^a. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:805
- 39.-*Manual para el manejo de residuos peligrosos y Bioseguridad*. InDRE SSA México 2000.Pag.:78.
- 40.- <http://www.who.int/es/>
- 41.-*Manual para el manejo de residuos peligrosos y Bioseguridad*. InDRE SSA México 2000.Pag.:31-32.
- 42.- *Manual para el manejo de residuos peligrosos y Bioseguridad*. InDRE SSA México 2000.Pag.:32-34.

- 43.-Jawetz Ernest; Melnick L. Joseph; Adelberg A. Edward. Microbiología Médica.12ªEl manual moderno. México, 1987.Pc.:28.
- 44.-Londoño O. Amparo, Quintero M. María L., Hernández T. María G. Manual de microbiología general I, para QFB. U.N.A.M. 2005. Pag.:23-26.
- 45.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:806
- 46.- Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. Entidad Nacional de Acreditación, Revisión 3. Noviembre 2002, Anexo1.
- 47.- Londoño O. Amparo, Quintero M. María L., Hernández T. María G. Manual de microbiología general I, para QFB. U.N.A.M. 2005.Pag:46-73.
- 48.- <http://www.atcc.org/>
- 49.-MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:303.
- 50.-MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:416.
- 51.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:113-127;206-216;306-311.
- 52.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. 2ªed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag:324-326.
- 53.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:92-97.
- 54.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:113-127.
- 55.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:223-235.
- 56.- Zimbardo, B.S. Mary Jo, et. All. Difco™ and BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. 2ªed. Becton, Dickinson and Company. US 2009.Pag:15.
- 57.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:808.

- 58.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:817.
- 59.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:823.
- 60.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Pag.:822.
- 61.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Apéndice 5. Pag: 764-765.
- 62.- Londoño O. Amparo, Quintero M. María L., Hernández T. María G. Manual de microbiología general I, para QFB. U.N.A.M. 2005. Pag.:19-20.
- 63.- Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y diluciones de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- 64.- NMX-AA-102-SCFI-2006 Calidad del agua – Detección y enumeración de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* presuntiva – Método de filtración en membrana.
Water quality– Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive *Escherichia coli* – Membrane filtration method. Pag:6.
- 65.- MacFaddin F. Jean. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia clínica. 3ª. Edición, Editorial Médica Panamericana, México. D.F. Apéndice 6. Pag.:772.
- 66.- Miles, A.A. and Misra, S.S. 1938. The stimation of the bacterial power of the blood. J. Hyg.38:732 – 749.