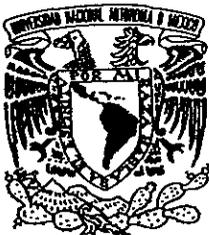


2ef

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA".**

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROGRAMA INTEGRAL DE  
CONTROL DE CALIDAD Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS EN EL  
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.**



**TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO  
PRESENTA:  
ROMERO DÍAZ GABRIEL ALEJANDRO.**

**NOMBRE DEL DIRECTOR: Q.F.B. MARTHA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ.  
NOMBRE DEL ASESOR. Q.F.B. ANTONINO SÁENZ PRIETO.**

**LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO: LABORATORIO DE  
ANÁLISIS CLÍNICOS DE LA UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE ATENCIÓN  
INTEGRAL (U.M.A.I.) "ESTADO DE MÉXICO".**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

265312



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

A mi madre:  
Que gracias a su apoyo hizo posible todo esto.  
Gracias.

## *AGRADECIMIENTOS.*

A **DIOS** que me envía sus bendiciones y me ha dado la oportunidad de alcanzar una de mis metas más importantes.

A mi madre Guadalupe, a mi hermana Georgina, por el apoyo, cariño y comprensión que siempre me han brindado, y por todos esos momentos que hemos compartido juntos.

A mi primo Alberto, mi sobrino Edgar, mi abuelita Josefina y a mi tío Roberto por el apoyo y ayuda recibida durante el desarrollo de este trabajo.

Al Q.F.B. Antonino Sáenz Prieto y a la Q.F.B. Martha Sánchez Rodríguez por haber guiado y colaborado en la elaboración de esta tesis.

A todos mis profesores y sinodales por la enseñanza recibida durante todos estos años de carrera.

*GRACIAS...*

## INTRODUCCIÓN.

El presente trabajo se encuentra enfocado al control de calidad en el área de microbiología clínica, así como a la validación de dos técnicas diferentes para realizar antibiogramas .

El programa de control de calidad desarrollado, abarca diferentes etapas dentro del área de microbiología, comprendiendo el control de rutina (documentación, control de equipo, condiciones ambientales), el control preanalítico (toma de muestra), el control analítico (control de reactivos, medios de cultivo, pruebas bioquímicas, antibiogramas) y el control postanalítico (entrega de resultados).

En cuanto a la validación de antibiogramas, esta se aplicó a dos técnicas diferentes: 1) utilizando multidiscos, y 2) utilizando unidiscos. El análisis estadístico se realizó por medio de la determinación del coeficiente de variación para establecer la repetibilidad del sistema, mientras que la correlación existente entre resultados obtenidos por dos analistas diferentes se determinó por medio de una *t* de *student* para determinar la reproducibilidad del sistema.

Es importante recalcar que es necesario que se implanten programas de validación y control de calidad en todos los laboratorios de análisis clínicos, ya que con esto se garantiza que todos los métodos empleados por el laboratorio cumplan con los requisitos para los que fueron desarrollados, obteniendo con esto resultados de calidad, es decir, confiables, que no pongan en juego la salud del paciente.

## ÍNDICE.

	Pág.
<b>Introducción.</b>	1
<b>Índice.</b>	2
<b>Marco Teórico.</b>	
I. Microbiología clínica.	4
• Historia de la microbiología.	4
• Antimicrobianos.	7
II. Control de Calidad y microbiología Clínica.	15
• Historia de la calidad.	15
• Calidad y Control Total de la Calidad.	16
• El Control de Calidad en el laboratorio clínico.	17
• El laboratorio de microbiología y el Control de Calidad.	23
<b>Planteamiento del problema.</b>	27
<b>Justificación.</b>	28
<b>Objetivos.</b>	29
<b>Hipótesis.</b>	30
<b>Material y métodos.</b>	31
<b>Resultados.</b>	62
<b>Discusión de resultados.</b>	86
<b>Conclusiones.</b>	93
<b>Apéndices.</b>	94
<b>Bibliografía.</b>	96

- **ESTABLECIMIENTO DE UN PROGRAMA INTEGRAL DE CONTROL DE CALIDAD Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. -**

## MARCO TEÓRICO.

### SECCIÓN I MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.

#### I- HISTORIA DE LA MICROBIOLOGÍA.

La microbiología es una ciencia que se ocupa del conocimiento de los microbios, es decir, investiga la biología de los organismos microscópicos. La microbiología constituye, mejor que cualquier otra rama de la biología, un ejemplo de las complejas interrelaciones entre las ciencias y su historia, está en gran parte, directamente relacionada con los adelantos que abrieron nuevos campos a la investigación.<sup>1</sup>

A pesar de que durante mucho tiempo la observación de los fenómenos de putrefacción de la materia orgánica, de las enfermedades infecciosas, de las fermentaciones y de otros procesos naturales llevó a considerar la existencia de criaturas tan pequeñas que no podían ser observadas a simple vista, el descubrimiento de los microorganismos se asocia con el desarrollo de la ciencia óptica, con la cual se pudieron obtener lentes de un poder de resolución elevado. Sin embargo, ya antes de esta época, en 1546, Fracastoro de Verona sugiere la existencia de un *contagium vivum* como causa de enfermedad, y Von Plenciiz, en 1763, aboga por vez primera por el criterio de especificidad de las enfermedades infecciosas; no obstante, estas afirmaciones eran simples suposiciones carentes en absoluto de base experimental.<sup>1,2</sup>

Aunque, en 1559, Kircher señala la presencia de “pequeños gusanos” en la sangre de los enfermos de peste bubónica, las primeras observaciones fueron realizadas por un comerciante holandés, Anton van Leeuwenhoek a fines del siglo XVII y comienzos del XVIII, quién empleó microscopios simples hechos por él mismo. Los microscopios de Leeuwenhoek eran muy imperfectos si se comparan con los estándares actuales, pero mediante cuidadosas manipulaciones y un buen enfoque fue capaz de observar una gran variedad de microbios en las aguas estancadas, infusiones y sarro dental. El 24 de abril de 1676 comunicó a la Royal Society de Londres la observación de un increíble número de pequeños animales o “animalículos” que presentaban formas diversas: esféricas, cilíndricas o en espiral. Dado que utilizó lentes simples con un máximo de 300 aumentos, es de suponer que sólo observó bacterias de gran tamaño, pero sus descripciones fueron una de las contribuciones más importantes en el campo de la biología.<sup>1,2</sup>

Sin embargo, la microbiología como ciencia se desarrolló apenas en la última parte del siglo XIX; este retraso se debió a que además del microscopio, eran necesarias algunas técnicas básicas para el estudio de los microorganismos. En el siglo XIX la investigación de dos preguntas importantes dió lugar al desarrollo de estas técnicas y dejó sentadas las bases para la fundación de la ciencia microbiótica: 1) ¿Se da la generación espontánea?, 2) ¿Cual es la naturaleza de las enfermedades contagiosas?. El estudio de estas dos preguntas fue paralelo, quedando contestadas a fines de este siglo, estableciéndose así las bases de la microbiología como ciencia independiente y en desarrollo.<sup>2</sup>

### **La teoría de la enfermedad por gérmenes.**

Aún en el siglo XVI se pensaba que algo podía transmitirse de una persona enferma a una sana para inducir en esta última la enfermedad de la primera. Muchas enfermedades parecían que se diseminaban a través de las poblaciones y recibieron el nombre de contagiosas, la causa desconocida responsable de la diseminación recibió a su vez el nombre de contagio. Cuando el descubrimiento de los microorganismos fue más o menos aceptado, se pensó que éstos eran los responsables de las enfermedades contagiosas, aunque hacían falta pruebas. Fue gracias al trabajo efectuado por Koch, que la teoría de los gérmenes como responsables de las enfermedades adquirió bases sólidas.<sup>1</sup>

En sus trabajos iniciales publicados en 1876, Koch estudió el ántrax, enfermedad del ganado que en ocasiones también se presenta en el hombre. El ántrax es producido por una bacteria esporulada que recibe el nombre de *Bacillus anthracis*, y en la sangre de un animal infectado con ella abundan las células de esta bacteria. Koch dejó establecido, por medio de un análisis microscópico cuidadoso, que las bacterias siempre estaban presentes en la sangre de animales que padecían esta enfermedad. Sin embargo, sabía que la mera asociación de bacterias y enfermedad no era una demostración de que las bacterias la produjeran. Cabía la posibilidad de que fuera a la inversa. Por tanto, demostró que era posible tomar una pequeña cantidad de sangre de un animal enfermo e inyectarla a otro y nuevamente reproducir los síntomas característicos de la enfermedad. Repitiendo este proceso 20 veces, Koch transfirió exitosamente de un animal a otro pequeñas cantidades de sangre que contenían bacterias y demostró que en realidad eran las responsables del ántrax.

Llevando todavía más adelante este experimento, encontró que las bacterias podían ser cultivadas en líquidos nutritivos fuera del cuerpo animal y, aún después de muchas transferencias en cultivo, las bacterias podían causar la enfermedad cuando se reinoculaban en un animal. Tanto las de un animal enfermo como las provenientes de un cultivo provocaban los mismos síntomas si eran inoculadas. Basándose en éste y otros experimentos, formuló los siguientes criterios, que reciben en la actualidad el nombre de postulados de Koch, para demostrar que cada tipo de bacteria produce una enfermedad específica:

1. El organismo siempre debe encontrarse en los animales que sufren la enfermedad y no en individuos sanos.

2. El organismo debe aislarse en cultivos puros, aparte de estar presente en el cuerpo del animal.

3. Tales cultivos, cuando son inoculados en animales susceptibles, deben desencadenar los síntomas característicos de la enfermedad.

4. El organismo debe ser reaislado de estos animales experimentales y cultivado nuevamente en el laboratorio, después de lo cual debe seguir siendo el mismo.<sup>1,2</sup>

Los postulados de Koch no sólo proporcionaron un medio para mostrar que organismos específicos producen enfermedades específicas, sino que también dió un tremendo ímpetu al desarrollo de la ciencia de la microbiología recalcando la importancia del empleo de los cultivos de laboratorio.

### Quimioterápicos.

A la vez que se aislaban en rápida sucesión los agentes causales de las enfermedades infecciosas, se descubrían los mecanismos de la inmunidad y los métodos para combatirlas, como las vacunas, los sueros antitóxicos y los quimioterápicos.

Aunque el empleo de sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas se inició hace ya siglos por métodos empíricos, el verdadero fundador de la quimioterapia fue Paul Ehrlich, en Alemania, mientras estudiaba medicina en 1870. Ehrlich introdujo colorantes que todavía se usan en histología para la tinción selectiva de los componentes basófilos y acidófilos celulares y posteriormente formuló la teoría de la "cadena lateral" para explicar las interacciones extraordinariamente específicas de los anticuerpos y los antígenos. Ehrlich, apoyándose en esta teoría y en la acción de los colorantes, consideró que cualquier sustancia tóxica, para poder ejercer su acción, debía fijarse químicamente sobre la materia viva, ya fueran células del organismo o agentes patógenos. Esto le impulsó a buscar sustancias que presentaran capacidad de fijación selectiva, es decir, que siendo capaces de fijarse sobre los patógenos no tuvieran afinidad por las células del huésped. Después de un gran número de ensayos llegó el descubrimiento de un arsenical, el Salvarsan, que fue utilizado durante mucho tiempo en el tratamiento de la sífilis. Este descubrimiento fue seguido por el de otros quimioterápicos, arsenicales orgánicos, antimoniales y antipalúdicos de síntesis, hasta que, en 1935, Domagk, en Alemania desarrolló un colorante, el Prontosil, cuyo núcleo activo, la p-aminobencenosulfonamida, por sustitución de diversos radicales ha dado lugar al aislamiento de gran número de compuestos, que se conocen con el nombre genérico de sulfamidas. Por otra parte, en 1929, Fleming realizó la observación de un fenómeno de antagonismo bacteriano entre un hongo (*Penicillium notatum*) y los estafilococos: al contaminar espontáneamente las esporas del hongo, vehiculadas por el aire, una placa de un cultivo de estafilococos, habían inhibido el desarrollo de estos organismos. Esta observación fundamental determinó que, en 1940, Florey y Chain aislaran el primer antibiótico conocido, la penicilina, y que en años más tarde por el estudio de un

actinomiceto del suelo (*Streptomyces griseus*) se llegará al descubrimiento de la estreptomycin por Waksman. En las décadas siguientes, la investigación exhaustiva de microorganismos del suelo ha permitido el aislamiento de varios centenares de antibióticos, de los cuales alrededor de cien se han demostrado de utilidad clínica.<sup>1,3,4</sup>

## II.- ANTIMICROBIANOS

Los compuestos químicos con acción antimicrobiana pueden ser clasificados en dos grandes grupos, antibióticos y quimioterápicos. El término "antibiótico" se utiliza siempre para conceptuar todas las sustancias orgánicas producidas por microorganismos que fueran capaces de actuar sobre otros microorganismos inhibiendo su crecimiento o destruyéndolos, mientras que el término "quimioterápico" se utiliza para aquellas sustancias obtenidas por síntesis química, aunque la tendencia actual es la de agruparlos bajo el título de "agentes antimicrobianos". Para que una sustancia pueda ser considerada como "antibiótico" debe cumplir, de acuerdo con Waksman y cols.(1941), las siguientes condiciones:

*i) Especificidad:* Se traduce en el espectro de acción del antibiótico, consistente en su actuación frente a un grupo determinado y limitado de microorganismos. Este comportamiento se debe a que los antibióticos actúan en un lugar anatómico concreto de la bacteria, que es específico de cada antibiótico.

Unos se fijan en una molécula y bloquean su acción, y otros alteran una línea metabólica fundamental para la bacteria. Es el sitio de acción, o "blanco molecular", del antibiótico, cuyo bloqueo o modificación se traduce en cambios metabólicos trascendentes para la vida del microorganismo.<sup>1,5</sup>

*ii) Elevada potencia biológica:* Es decir, que sea activo a pequeñas concentraciones; actividad que suele expresarse como concentración inhibitoria mínima (CIM), equivalente a la cantidad mínima necesaria para impedir el crecimiento de un microorganismo en condiciones estandarizadas. Para la mayoría de los agentes antimicrobianos de eficacia clínica, las CIM frente a microorganismos totalmente sensibles varían entre 100 y 0.01 mg/ml o cifras inferiores, y, para una terapia eficaz, habitualmente parecen requerirse niveles superiores a la CIM en el lugar donde se produce la infección.<sup>1,5</sup>

*iii) Toxicidad selectiva:* Un antibiótico ideal presenta toxicidad selectiva. Este término implica que el medicamento es nocivo para el microorganismo infectante sin serlo para el huésped. En muchos casos, la toxicidad es relativa, lo que significa que un medicamento puede dañar a un microorganismo a una concentración que el huésped puede tolerar. La toxicidad selectiva, por lo general depende de la inhibición de fenómenos bioquímicos que se presentan en o que son esenciales en el microorganismo, pero no para el huésped.<sup>6</sup>

## 1. Clasificación de los antimicrobianos.

Los criterios de clasificación de los antimicrobianos son diversos, lo que origina varias claves que han permitido agruparlos según su origen, estructura química y actividad.

*i) Por su origen, se pueden dividir en:*

a) Biológicos. Son producidos por microorganismos, lo que permite subdividirlos a su vez en: antimicrobianos elaborados por bacterias típicas (p. ej. polímixinas por *Bacillus polymixa*), actinomicetos (p.ej. cloranfenicol por *S. venezuelae*) y hongos (p.ej. penicilina por *Penicillium notatum*).

b) Sintéticos. Son producidos exclusivamente por síntesis química. Son ejemplos de ellos los nitrofuranos y las sulfamidas.

c) Semisintéticos. En la actualidad constituyen el grupo más numeroso e importante. Sobre el núcleo básico del antibiótico, producido por el microorganismo, se engarzan en la posición más adecuada radicales obtenidos por síntesis, confiriendo: mejora del espectro, de la farmacocinética, disminución de la toxicidad, etc.<sup>1,4,5</sup>

*ii) Por su espectro de acción.* El rango de actividad de un antimicrobiano se denomina espectro, término utilizado para describir los géneros y especies frente a los cuales ha demostrado ser activo. De acuerdo a esta característica pueden clasificarse en:

a) De amplio espectro, como el cloranfenicol y las tetraciclinas, que interfieren en el crecimiento de numerosas especies bacterianas.

b) De espectro intermedio, que actúan frente a un número más limitado de especies (p.ej. penicilinas, macrólidos).

c) De espectro reducido, que, como las polimixinas, sólo tienen un comportamiento eficaz frente a un número limitado de especies.<sup>5</sup>

*iii) Por su forma de acción, pueden dividirse en:*

a) Bacteriostáticos: que bloquean el desarrollo y multiplicación de las bacterias, pero no las lisan, por lo que al retirar el antimicrobiano su efecto es reversible.

b) Bactericida: que provocan la muerte bacteriana, con lo que el proceso es irreversible.<sup>4,5,6</sup>

*iv) Por el mecanismo de acción.* Para la mayor parte de los antibióticos, no se comprenden por completo sus mecanismos de acción. No obstante, para fines de discusión, es conveniente presentar los mecanismos bajo cuatro diferentes encabezados:

- a) Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- b) Alteración de la permeabilidad de la membrana celular o el transporte activo a través de la misma.
- c) Inhibición de la síntesis de proteínas (es decir, la inhibición de la traducción y transcripción del material genético).
- d) Inhibición de la síntesis de ácido nucléico.

v) *Por la estructura química.* Es la más utilizada y puede introducir otros parámetros para una correcta adecuación clínico-microbiológica. Sobre la base de su estructura y composición, los antimicrobianos se agrupan en familias que tienen características comunes no sólo químicas, sino también mecanismo de acción y espectro semejantes. Dentro de cada familia pueden separarse subgrupos por matices, como espectro de acción, y estabilidad enzimática, diferenciándose en el grupo sobre todo con base en la tolerancia, farmacocinética., etc. Las familias y grupos más importantes son:<sup>1,4</sup>

- I.  $\beta$ -lactámicos**
  - Penicilinas
  - Cefalosporinas
  - Cefamicinas
  - Oxacefeminas
  - Clavaminas
  - Carbapeneminas
  - Monobactámicos
  - Etc.
- II. Aminociclitolos**
  - Espectinomycinina
  - Aminoglicósidos
- III. Polipeptídicos**
- IV. Tetraciclinas**
- V. Cloranfenicol y derivados**
- VI. Macrólidos**
- VII. Lincosamidas**
- VIII. Rifamicinas**
- IX. Fosfomicina**
- X. Sulfamidas**
- XI. Nitrofurantoína**
- XII. Quinolonas**
- XIII. Derivados nitroheterocíclicos**
- XIV. Antifúngicos**

## 2. Mecanismos de acción de los antimicrobianos.

Para que un antimicrobiano ejerza su acción, es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias y alcance intracelularmente la concentración necesaria. La entrada en la bacteria se puede lograr por difusión o transporte activo. En el aspecto molecular, los antimicrobianos de uso en clínica pueden ejercer su acción en las siguientes estructuras o funciones:

a) Acción antibiótica por inhibición de la síntesis de la pared celular (Bacitracina, cefalosporinas, cicloserina, penicilinas, vancomicina).

En contraste con las células animales, las bacterias poseen una capa externa rígida denominada pared celular, la cual rodea por completo la membrana celular citoplásmica. Mantiene la forma del microorganismo y "contiene" a la célula bacteriana, que posee una presión osmótica interna inusualmente alta. En las bacterias gramnegativas, la parte más externa de la pared celular está formada por una bicapa de lípidos llamada membrana externa. La presión interna es 3 a 5 veces mayor en las bacterias grampositivas que en las bacterias gramnegativas. La pared celular contiene un polímero complejo entrelazado, químicamente diferenciable, denominado peptidoglucano, compuesto de polisacáridos y péptidos. Por lo general los polisacáridos se componen de los aminoácidos N-acetilglucosamina y ácido acetilmurámico; este último sólo se localiza en las bacterias. A los aminoazúcares se les unen pequeñas cadenas peptídicas. La rigidez final de la pared celular dependerá del entrelazamiento de las cadenas peptídicas como resultado de las reacciones de transpeptidación llevadas a cabo por varias enzimas. La capa de peptidoglucanos es mucho más gruesa en la pared celular de las bacterias grampositivas que en la de las gramnegativas.<sup>1,5,6</sup>

### i) Inhibición de la transpeptidación (beta-lactámicos)

Todas las penicilinas y cefalosporinas (antibióticos beta lactámicos) son inhibidores selectivos de la síntesis de la pared celular bacteriana. Aunque ésta es sólo una de las diversas actividades de estos medicamentos, quizá es la mejor comprendida. El paso inicial de la acción del fármaco consiste en su fijación a ciertos receptores celulares, llamados proteínas fijadoras de penicilina (PBP, del inglés *penicillin-binding-proteins*), los cuales, llegan a ser de 3 a 6 en muchas bacterias. Distintos receptores (PBP) pueden poseer diferentes afinidades para un medicamento, y cada uno puede mediar un tipo distinto de acción.

Las PBP se encuentran bajo control microsómico, y las mutaciones pueden alterar su número y afinidades por los medicamentos beta lactámicos específicos. Después de que un beta lactámico se ha unido a sus receptores, se inhibe la reacción de transeptidación y se bloquea la síntesis de peptidoglucanos. El siguiente paso probablemente implica la eliminación o inactivación de un inhibidor de las enzimas autolíticas (hidrolasas) en la pared celular. Esto activa a las enzimas líticas en algunos microorganismos y puede causar la lisis si el ambiente es isotónico. En un ambiente hipertónico (por ejemplo sacarosa al 20%), los microbios pueden cambiar a protoplastos o esferoplastos cubiertos sólo por una frágil membrana celular.

La inhibición de las enzimas de transeptidación por las penicilinas y cefalosporinas puede deberse a una similitud estructural de estos medicamentos a la acil-D-alanil-D-alanina. La notable falta de toxicidad de los antibióticos beta-lactámicos para las células de los mamíferos se atribuye a la ausencia de una pared celular de peptidoglucano en éstas.

#### *ii) Inhibición de la síntesis precursora de peptidoglucanos.*

Otros medicamentos, inhiben los primeros pasos de la biosíntesis de los peptidoglucanos. Puesto que los primeros pasos de la síntesis tienen lugar dentro de la membrana citoplásmica, estos medicamentos deben penetrar la membrana para ser eficaces. Ejemplos de éstos son:

- Bacitracina: Inhibe la hidrólisis o desfosforilación del lípido pirofosfato, así éste no puede reutilizarse de nuevo en el transporte de polímeros lineales de disacárido-pentapéptido a través de la membrana citoplásmica.

- Vancomicina: Impide la transferencia del disacárido pentapéptido, unido al lípido portador de la membrana citoplásmica, al aceptor de la pared celular. Esto se consigue uniéndose a la D-alanil-D-alanina terminal del pentapéptido disacárido, lo que impide la actuación del peptidoglucanosintetasa. De forma similar actúa la ristocetina.

- Fosfomicina: Interfiere la condensación de la UDP-GlcNAc con el fosfoenol-piruvato para formar el éter enólico del UDP-GlcNAc-piruvato. Esta reacción es inhibida porque la fosfomicina se une covalentemente con la transferasa que la cataliza, a causa de su analogía estructural con el fosfoenol-piruvato.

- Cicloserina, un análogo de la D-alanina, bloquea la acción de la alanina racemasa, una enzima esencial en la incorporación de la D-alanina en el pentapéptido del peptidoglucano.<sup>1,5,6</sup>

**b) Acción antibiótica por inhibición de la función de la membrana celular (polienos y polimixinas).**

La membrana celular o citoplásmica es vital para todas las células, ya que entre sus propiedades incluye el actuar como barrera de permeabilidad selectiva, controlando de esta forma la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, permiten la salida de iones  $K^{(+)}$  y macromoléculas, como los ácidos nucleicos y causan un efecto lítico.

Las polimixinas se comportan como detergentes catiónicos. Son polipéptidos con un extremo liposoluble y otro hidrosoluble. El primero se une a los fosfolípidos de la membrana citoplásmica bacteriana y el segundo penetra en la parte hidrofílica. De esta forma se desorganiza esta estructura y aumenta su permeabilidad, con la pérdida de metabolitos esenciales y muerte bacteriana como resultado final. Las bacterias más susceptibles son las que tienen en su membrana mayor cantidad de fosfolípidos (gramnegativas). La insensibilidad o resistencia está en relación con la impermeabilidad de la pared celular para estos fármacos, como es el caso de las grampositivas que tienen una pared celular muy gruesa.

Los antibióticos poliénicos (nistatina y anfotericina B) son activos frente a hongos, poseen una parte de su molécula con numerosos enlaces (polieno) hidrofóbica y, además, otra hidrofílica. La porción hidrofóbica se une con los esteroides de la membrana celular de los hongos, introduciendo a su vez la parte hidrofílica. De esta forma no sólo se altera la forma de la membrana, sino que, además, se forman poros hidrofílicos y se modifica la permeabilidad normal de esta estructura.

Todos estos antibióticos son líticos, incluso en bacterias en reposo, y tienen cierto potencial tóxico, especialmente la anfotericina B, ya que son capaces de unirse con los lípidos de las membranas citoplásmicas de las células de los mamíferos.<sup>1,5,6</sup>

**c) Acción antibiótica por inhibición de la síntesis de proteínas ( Aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos [eritromicinas], cloramfenicol, lincomicinas).**

Se ha establecido que los aminoglucósidos, tetraciclinas, cloramfenicol, macrólidos y lincomicinas pueden inhibir la síntesis de proteínas mediante la acción sobre los ribosomas en las bacterias.

Las bacterias tienen ribosomas 70S, en tanto que las células de mamíferos tienen ribosomas 80S. Las subunidades de cada tipo de ribosoma, su composición química y sus especificidades funcionales son lo suficientemente diferentes para explicar por qué los antibióticos pueden inhibir la síntesis de proteínas en los ribosomas bacterianos, sin tener mayor efecto sobre los ribosomas de los mamíferos.

En la síntesis normal de proteínas microbianas el mensaje del mRNA es leído, de manera simultánea, por varios ribosomas que se extienden a lo largo de la cadena de mRNA. Estos son los llamados polisomas.

#### *i) Aminoglucósidos.*

De hecho, se ha estudiado más el modo de acción de la estreptomina que de cualquier otro aminoglucósido (Kanamicina, neomicina, gentamicina, netilmicina, amikacina, etc), pero probablemente todos actúan de manera similar. El primer paso es la fijación del aminoglucósido a una proteína receptora específica (P 12 en el caso de la estreptomina) en la subunidad 30S del ribosoma 70S microbiano. Segundo, los aminoglucósidos bloquean la actividad normal del complejo de iniciación para la formación de péptidos (mRNA + formil metionina + tRNA). Tercero, el mensaje del mRNA es mal leído en la región de reconocimiento del ribosoma y, como resultado, el aminoácido erróneo se inserta en el péptido, originando una proteína no funcional. Cuarto, la fijación a los aminoglucósidos causa la degradación de los polisomas y su separación en monosomas incapaces de llevar a cabo una síntesis de proteínas. Estas acciones se presentan más o menos de manera simultánea y el efecto global suele ser irreversible, causando la muerte de la célula.

#### *ii) Tetraciclinas.*

Las tetraciclinas se fijan a la subunidad 30S de los ribosomas microbianos. Estas inhiben la síntesis de proteínas mediante el bloqueo de la fijación del aminoacil-tRNA cargado y así, evitan la introducción de nuevos aminoácidos en la naciente cadena peptídica. La acción suele ser bacteriostática y reversible al suspender el medicamento.

#### *iii) Cloramfenicol.*

El cloramfenicol se fija a la subunidad 50S del ribosoma, e interfiere con la fijación de los nuevos aminoácidos a la naciente cadena peptídica, debido en gran parte, a que el cloramfenicol inhibe la peptidiltransferasa. El cloramfenicol es principalmente bacterostático, y el desarrollo de los microorganismos se reanuda cuando se suspende el medicamento.

#### *iv) Macrólidos (eritromicinas).*

Estos medicamentos se fijan a la subunidad 50S de los ribosomas y pueden competir con las lincomicinas por los sitios de fijación (un rRNA 23S). Los macrólidos pueden interferir con la formación de complejos de inicio para la síntesis de cadenas de péptidos o con las reacciones de aminoacil translocación.

v) *Lincomicinas (clindamicina).*

Las lincomicinas se fijan a la subunidad 50S del ribosoma microbiano y se confunden con los macrólidos en el sitio de fijación, actividad antibacteriana y modo de acción.<sup>1,5,6</sup>

**d) Acción antibiótica por inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Quinolonas, rifampicina, sulfonamidas, trimetoprim).**

Todas las quinolonas y las fluoroquinolonas son potentes inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos. Bloquean la acción de la DNA girasa (topoisomerasa II), la enzima causante del empaquetamiento y desempaquetamiento de la superespiral de DNA.

La rifampicina inhibe el desarrollo bacteriano mediante su fuerte fijación a la RNA polimerasa dependiente de DNA de las bacterias. así, inhibe la síntesis del RNA bacteriano. La resistencia a este fármaco se desarrolla como una mutación cromosómica de alta frecuencia que resulta en un cambio en la RNA polimerasa.

Para muchos microorganismos, el ácido p-aminobenzoico (del inglés p-aminobenzoic acid, PABA) constituye un metabolito esencial. Es utilizado por éstos como un precursor para la síntesis de ácido fólico en la vía que lleva a la síntesis de ácidos nucleicos. Es probable que el modo de acción específico del PABA implique una condensación de pteridina con el PABA, dependiente de trifosfato de adenosina (ATP), para producir ácido dihidropteróico, que posteriormente se convierte en ácido fólico. Las sulfonamidas son análogos estructurales del PABA e inhiben la dehidropteroato sintetasa.

Las sulfonamidas pueden entrar en la reacción en lugar del PABA y competir por el sitio activo de la enzima. Como resultado, se forman análogos no funcionales de ácido fólico, evitando el desarrollo posterior de las células bacterianas. La acción inhibidora de las sulfonamidas en el desarrollo bacteriano puede ser contrarrestada por un exceso de PABA en el ambiente (inhibición competitiva). Las células animales no pueden sintetizar ácido fólico y deben depender de fuentes exógenas; por tanto, son resistentes a la acción de las sulfonamidas.

El trimetoprim inhibe a la ácido dihidrofólico reductasa de las bacterias 50,000 veces más rápido que la misma enzima de los mamíferos. Esta enzima reduce el ácido dehidrofólico en tetrahidrofólico, una etapa que lleva a la síntesis de purinas y por último de DNA. Las sulfonamidas y el trimetoprim producen un bloqueo secuencial de esta vía, lo que resulta en una potenciación notable (sinergismo) de actividad.<sup>1,4,5,6</sup>

## SECCIÓN II. CONTROL DE CALIDAD Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.

### **I. HISTORIA DE LA CALIDAD.**

Desde los tiempos de los jefes tribales, reyes y faraones han existido las cuestiones sobre la calidad. El Código de Hammurabi, que data del año 2150 a.C., declara: "si un albañil construye una casa para un hombre, y su trabajo no es fuerte y la casa se derrumba matando a su dueño, el albañil será condenado a muerte". Los inspectores fenicios suprimieron todas las transgresiones repetidas de las normas de la calidad, cortándole la mano a quien hacía un producto defectuoso; aceptaban o rechazaban los productos y ponían en vigor las especificaciones gubernamentales. Los inspectores egipcios y los mayas, en América Central, comprobaban las medidas de los bloques de piedra con un pedazo de cordel mientras los picapedreros observaban. Todas estas civilizaciones antiguas daban gran importancia a la equidad en los negocios y cómo resolver las quejas.<sup>7</sup>

Durante el siglo XIII empezaron a existir los aprendices y los gremios; el gobierno fijaba y proporcionaba normas (por ejemplo, pesas y medidas) y, en la mayor parte de los casos, un individuo podía inspeccionar todos los productos y establecer un patrón de calidad único. Con el advenimiento de la Revolución Industrial, la producción en masa de los productos manufacturados se hizo posible mediante la división del trabajo y la creación de partes intercambiables. Siendo a fines del siglo XIX cuando comenzó a surgir el sistema industrial moderno.<sup>7</sup>

La llegada de la Segunda Guerra Mundial apresuró el paso de la tecnología de la calidad. La necesidad de mejorar la calidad del producto dió por resultado un aumento en el estudio de la tecnología del control de la calidad. Fue en este medio ambiente donde se expandieron rápidamente los conceptos básicos del control de la calidad. En 1946 se instituyó en Estados Unidos, la ASQC (American Society for Quality Control: Sociedad Americana del Control de la Calidad), y en los años cincuenta y sesenta, Armand V. Feigenbaum fijó los principios básicos del control de la calidad total.

Hoy en día, muchas organizaciones se empeñan en lograr el mejoramiento de la calidad, no sólo en el área de la industria o en el área farmacéutica, sino también en el área clínica, en la que los profesionales de la salud deben enfrentarse al compromiso de utilizar eficientemente los recursos con los que cuenta el laboratorio clínico, y se desempeñan con calidad ejemplar.

## II. CALIDAD Y CONTROL TOTAL DE LA CALIDAD.

La calidad es una característica determinada por el consumidor de un producto o servicio, no por el ingeniero, ni el químico, ni la gerencia general. Está basada en la experiencia real del consumidor con el producto o servicio, medida contra sus requisitos -definidos o tácitos, conscientes o sólo percibidas, operacionales *técnicamente o por completo* subjetivos- y siempre representa un objetivo móvil en el mercado competitivo. En general, la calidad del producto y servicio puede definirse como: La resultante total de las características del producto y servicio en cuanto a mercadotecnia, ingeniería, fabricación y mantenimiento por medio de las cuales el producto o servicio en uso satisfaga las expectativas del consumidor. Algunos otros términos, como confiabilidad, facilidad para darle servicio y mantenimiento, en algunas ocasiones se han tomado como definiciones de la calidad del producto. Estos términos son, en realidad características individuales, que en conjunto constituyen la calidad del producto y servicio. Es importante reconocer este hecho, por que el requisito clave para establecer lo que se entiende por calidad, exige un equilibrio económico entre estas características individuales.<sup>8</sup>

Así, la meta de la industria competitiva, respecto a la calidad del producto, se puede exponer claramente: suministrar un producto o servicio en el cual su calidad haya sido diseñada, producida y sostenida a un costo económico y que satisfaga por entero al consumidor. En la frase "Control de Calidad", la palabra calidad no tiene el significado popular de "mejor" en sentido abstracto. Industrialmente quiere decir "mejor dentro de ciertas condiciones del consumidor"; ya sea que el producto sea tangible o intangible.<sup>8,9</sup>

El Control Total de la Calidad se refiere, por lo tanto, a un sistema efectivo de los esfuerzos de varios grupos en una empresa para la integración del desarrollo, del mantenimiento y de la superación de la calidad con el fin de hacer posibles mercadotecnia, ingeniería, fabricación y servicio, a satisfacción total del consumidor y al costo más económico. Ya que sus fundamentos son básicos, el control de calidad ha sido y puede ser usado en industrias orientadas hacia el producto que van desde electrónica para el consumidor, computadoras y generadores eléctricos para la industria farmacéutica, hasta las industrias orientadas al servicio, desde tiendas departamentales hasta cuidado médico y realización de análisis clínicos. A pesar de que los detalles del enfoque pueden ser diferentes entre las industrias y compañías, los fundamentos prevalecen. En el área clínica, el control de calidad debe permitir que, independientemente del laboratorio que realice las pruebas, se obtengan resultados muy similares. El paciente se beneficiará doblemente, de forma directa con los resultados obtenidos e indirectamente al aumentar la confianza del clínico en los resultados del laboratorio. También el control de calidad contribuye a mantener una moral elevada y la profesionalidad en el laboratorio al aumentar la confianza del personal en el trabajo que realiza.<sup>8,9</sup>

### **III. EL CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO.**

En un laboratorio de análisis clínicos se espera que el personal que labora ahí, utilice los recursos del laboratorio efectivamente y produzca resultados de laboratorio de alta calidad, para lograr esto, se debe remarcar que un laboratorio comprende tres componentes principales: la estructura, el proceso y el resultado. La estructura no se limita a las instalaciones físicas y equipo del laboratorio, o consiste en el patrón de organización de las responsabilidades, las autoridades y relaciones a través de las que el laboratorio lleva a cabo sus funciones. El proceso es el término para todos los pasos que involucran la toma, el transporte, la recepción y el análisis de la muestra y el reporte de los resultados, este conjunto de pasos individuales constituye el sistema del laboratorio. Es un grupo de recursos y actividades interrelacionados que transforman insumos en productos. Finalmente, el resultado es el producto o el servicio proveniente de las actividades o procesos que se hayan llevado a cabo en el laboratorio. No sólo es la producción de resultados de alta calidad sino que también incluye su interpretación adecuada y su aplicación al diagnóstico, monitoreo y tratamiento. Aunque algunos laboratorios de análisis clínicos consideran innecesarios los programas de control de calidad, muchos otros comienzan a tener consciencia de su necesidad, pero los consideran muy complicados y caros, especialmente los laboratorios pequeños, sin embargo, la existencia de numerosas *fuentes de error presentes en un laboratorio clínico* justifican de sobremanera la necesidad de llevar un control de calidad para así poder adoptar dentro del laboratorio un modelo de mejoría continua de la calidad.<sup>9,10</sup>

El término de mejoría continua de calidad se refiere tanto a una filosofía como a un sistema de manejo. No desecha los métodos tradicionales de control y garantía de calidad del laboratorio, sino que se trata de una extensión de esas actividades y requiere de un nuevo enfoque y una ampliación de actividades en la organización en la búsqueda de la calidad. La mejoría continua de la calidad son aquellas acciones necesarias para aumentar la efectividad y la eficiencia de la estructura, el proceso y los resultados mencionados anteriormente. La meta es proporcionar beneficios añadidos a la organización para beneficio de los usuarios.<sup>10</sup>

La mejoría continua de la calidad (MCC), por lo general, no se puede implementar en forma rápida, para que funcione el sistema de manejo de la MCC deben estar comprometidas las autoridades más altas de una organización. Sin embargo, aún si no se puede introducir globalmente el Control de Calidad Total, mucho se puede hacer para mejorar el trabajo del laboratorio y la forma en que se realiza. Existen algunos conceptos básicos que a continuación se mencionan, y que, llevarán a una mejoría de la calidad y que pueden constituir el fundamento del modelo MCC.

- Conocimiento de las personas a quienes sirve el laboratorio, lo que necesitan y lo que esperan los médicos directamente y los pacientes indirectamente.

- Concentración en lo que hace el laboratorio para lograr los resultados deseados: el proceso y los resultados.

- Incluir a todos los que realizan el trabajo: el enfoque de equipo.
- Estimular, guiar, facilitar: proporcionar liderazgo.
- Mejorar constantemente las actividades del laboratorio: mejora continua.<sup>10</sup>

El principio fundamental del manejo de la calidad es que un compromiso real de parte de todo el personal del laboratorio dará resultados más efectivos y más eficientes; los pasos básicos del manejo de calidad son los que se enumeran a continuación:

#### 1. La Estructura de Organización del Laboratorio debe incluir:

- un organigrama.
- una declaración del propósito, las funciones, las metas específicas, los objetivos medibles y la implementación del plan.
- Un mecanismo de visión y revisión del propósito, las metas y los objetivos.
- Un grupo de manejo gerencial del laboratorio con objetivos definidos y representatividad amplia del personal. Debe sesionar regularmente y llevar un registro resumido de los asuntos que se traten en las sesiones.
- Sesiones del personal completo del laboratorio para hacer recomendaciones sobre el propósito, las metas y el plan objetivo del laboratorio.
- Acuerdos con grupos de usuarios para establecer protocolos del uso adecuado de los servicios del laboratorio.<sup>10</sup>

2. Educación y entrenamiento. Cada miembro del personal del laboratorio debe familiarizarse con los avances y cambios en la teoría y la práctica de ese aspecto del laboratorio clínico en el cual se han especializado. Tanto el miembro del personal como el jefe son responsables de planear la capacitación continua a través de:

- un programa de orientación para empleados nuevos o para aquellos que regresan de alguna ausencia.
- la definición de criterios de desempeño que proporcionen una base para evaluar la superación.
- programas de educación en el servicio.
- asistencia a conferencias, talleres y seminarios.<sup>10</sup>

3. **Garantía de calidad.** Debe existir un programa planeado y sistemático de monitoreo y evaluación de los servicios de laboratorio para resolver problemas que se presenten y sean identificados. La garantía de calidad incluye las acciones sistemáticas y planeadas implementadas en el laboratorio necesarias para crear suficiente confianza de que un producto o un servicio cumple con los requisitos necesarios de calidad. En el laboratorio clínico se acostumbra considerar al control interno de calidad y a la evaluación externa de calidad como partes complementarias de la garantía de calidad.<sup>10</sup>

4. **Control de Calidad.** En general, los controles de calidad pueden adoptar dos formas:

- **Control de Calidad Interno:** es el grupo de procedimientos adoptados por el equipo de trabajo de un laboratorio para la evaluación continua del trabajo y de los resultados emergentes, para así decidir si son ó no suficientemente confiables para ser reportados a los clínicos o a los epidemiólogos.<sup>11</sup>

- **Control de Calidad Externo:** se refiere a un sistema de chequeo objetivo de los resultados de un laboratorio por medio de una agencia externa. Esta incluye la comparación de los resultados de un laboratorio con aquellos de otros laboratorios. La idea principal es establecer la comparabilidad de la precisión y exactitud de los diferentes métodos utilizados, así como conocer la distribución de frecuencias de los distintos resultados en función de las condiciones técnicas empleadas en los diversos laboratorios.<sup>12</sup>

Hay al menos cuatro métodos para desarrollar un programa de control de calidad externo:

i) **Inspecciones repetidas por personal especialmente preparado.** En ellas se deben revisar los protocolos de trabajo y establecer discusiones sobre control de calidad.

ii) **Pruebas de capacidad diagnóstica.** Se realizan por medio del envío de muestras supuestas. Estas pruebas en sí no son un mecanismo para mejorar la capacidad, sino simplemente indican lo que es necesario perfeccionar de las técnicas utilizadas.

iii) **Conferencias y cursos teórico-prácticos sobre control de calidad.** Es, posiblemente, el método más eficaz para mejorar la calidad del trabajo realizado y para el establecimiento de programas de control.

iv) **Actividades conjuntas dentro de las organizaciones profesionales.**

La adopción de un programa de control de calidad está en relación directa con el tamaño y capacidad diagnóstica del laboratorio.<sup>9</sup>

5. **Validación de los métodos analíticos.** Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método.<sup>13</sup>

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa, en este caso, en términos de parámetros analíticos.<sup>13</sup>

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y ha sido optimizado para propósitos prácticos de medición. En la aplicación de los criterios de evaluación de un método analítico prevalecerá ante todo la experiencia y el criterio de la persona que lleve a cabo la validación.<sup>13</sup>

- Creación de la infraestructura para la mejoría continua de la calidad:

Los laboratorios varían en tamaño, complejidad y en el número de pacientes que atienden. Algunos cuentan con el personal y los recursos materiales necesarios para crear una infraestructura de MCC bastante compleja en un tiempo corto. Otros tendrán que comenzar con una visión más limitada o tendrán que escoger sólo algunos aspectos críticos. En la figura 1, se muestra un enfoque simplificado, paso por paso, para lograr la mejoría continua de la calidad.<sup>10</sup>

i) Propósito, metas, funciones y objetivos. Debe existir una definición escrita del propósito, las funciones, las metas y los objetivos del laboratorio. Esta es la política de calidad. Debe identificar claramente a quién le da servicio y cuáles son sus necesidades y expectativas. Es la expresión formal por parte de la dirección de las intenciones globales y el objetivo del laboratorio con respecto a la calidad.

ii) Identificación de áreas de operación (AO). Es un paso importante para comprender la complejidad estructural de un laboratorio. Un laboratorio pequeño cuyas funciones, objetivos y metas sean limitados, y cuyo personal esté formado por pocos empleados puede realizar todos los análisis en una sola área de operación. Un laboratorio más grande y más complejo tendrá que contar áreas separadas para microbiología, química, hematología, inmunología, anatomía patológica, virología, banco de sangre, coagulación, patología forense o combinaciones de estas áreas. La identificación de estas áreas permite que todo el laboratorio sea más manejable a través de la división de la organización en componentes más pequeños.

iii) Identificación de las funciones principales dentro del AO. Estas son responsabilidades definidas ampliamente que describen las razones principales de la existencia de cada una de las áreas.

iv) Identificar el proceso de cada función. Un proceso es una serie de actividades y comunicaciones interrelacionadas, por ejemplo, el análisis e informe de enzimas cardíacas y hemocultivos son procesos que tienen un papel importante en el manejo del paciente. Pueden ser blancos de MCC legítimos en las secciones de química y microbiología respectivamente.

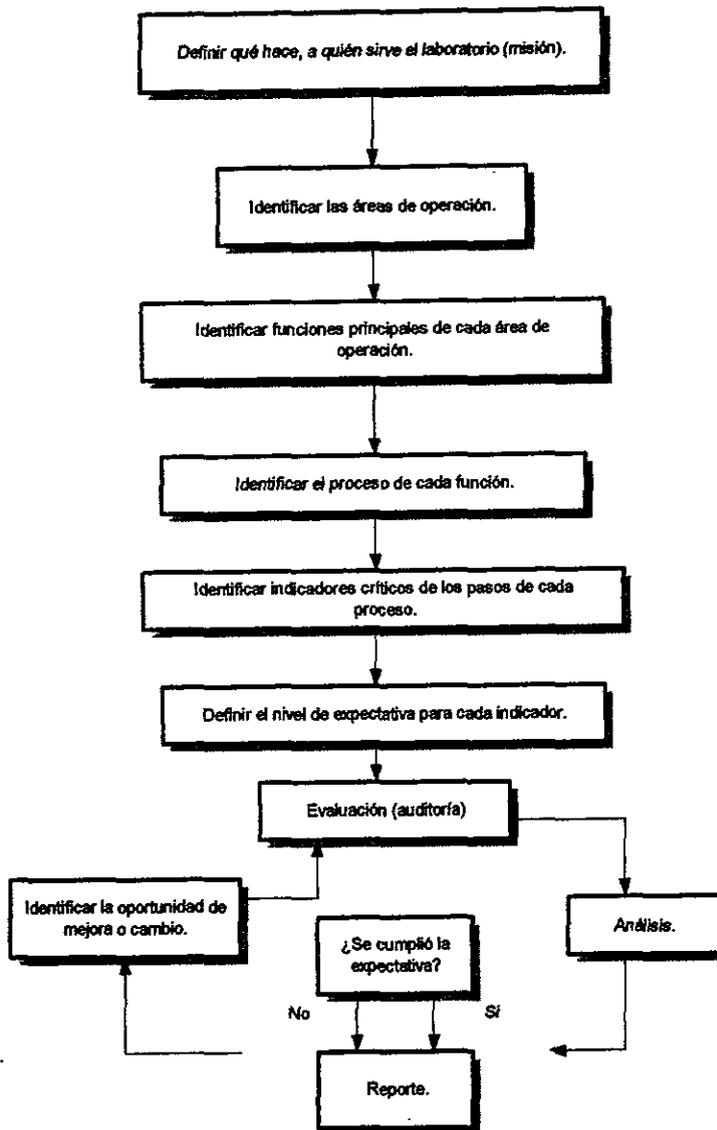


Figura 1. Enfoque simplificado, paso a paso, de la mejora continua de la calidad (MCC). Tomado de: Castillo M, Fonseca M, 1995.

v) Identificación de indicadores críticos de los pasos de cada proceso. Es importante elaborar un diagrama de los pasos de cada proceso desde el principio hasta el final. Una pequeña proporción de la variación en la calidad del proceso puede obedecer a cierta causa especial, por ejemplo, un error de tiempo en el sistema. Con mayor frecuencia surgen variaciones en el proceso causadas por sucesos aleatorios debidos a defectos inherentes al diseño del proceso. Una vez definidos los pasos del proceso, se deciden que partes deben monitorearse, esto es, los indicadores críticos de los pasos de cada proceso.

vi) Definir las “expectativas” de cada indicador . Debe haber una explicación clara de la utilidad de cada indicador así como de la forma en que se evalúa el proceso o el resultado. El indicador no es una medida directa de la calidad, pero es un marcador que identifica alguna característica especial de un servicio que necesite una revisión más cuidadosa. Un indicador de la calidad puede estar enfocado hacia una etapa del proceso, otra hacia el resultado. Un indicador fraccionario mide las veces en que sucede un evento divididas entre el total de probabilidades de que ocurra este evento. Tales indicaciones se prestan al análisis de patrones de cambio en el tiempo para detectar si ha habido mejora o deterioro en el proceso o en los resultados. La validez de un indicador es el grado por el cual identifica situaciones que requieren de mejoras en algún servicio o actividad. No todos los indicadores deben tener una base científica que respalde su validez real. En este caso se utiliza el término “validez aparente” que se refiere al sentido que tienen el indicador y la interpretación de los resultados que éste proporciona para un usuario bien informado.

vii) Medición (auditoría). Es necesaria una descripción clara y detallada de los datos que se deben recolectar y analizar para que distintos observadores reúnan la misma información de la misma manera y se puedan hacer comparaciones en distintos momentos. Una auditoría de la calidad es un análisis sistemático e independiente que determina si las actividades relacionadas con la calidad y sus resultados cumplen con los lineamientos propuestos y si se han implementado correctamente y son útiles para lograr los objetivos deseados.

viii) Análisis e informe. Los datos deberán analizarse para comprobar si las expectativas se han cumplido. Los resultados deberán repartirse entre todas las personas que participan en el proceso. Sólo así podrán enterarse todos los participantes de como progresa el proceso y convertirse en parte de la infraestructura del MCC.

ix) Identificar oportunidades de mejoramiento. Si no se cumplen las expectativas previstas se pueden proponer modificaciones para mejorar el desempeño, basándose en la información obtenida del indicador o del proceso analítico completo. La efectividad de los cambios se debe medir y analizar para ver si ha tenido un impacto positivo sobre la calidad del servicio.

El proceso completo de MCC puede invertir bastante tiempo y esfuerzo. Cada laboratorio puede diseñar su propio programa de acuerdo a sus circunstancias y tomar pasos individuales con respecto a su programa de vigilancia continua de la calidad.

#### IV. EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y EL CONTROL DE CALIDAD.

La actividad más importante del microbiólogo en medicina es aislar e identificar a los agentes causales de una enfermedad infecciosa. Esta área de la microbiología es llamada microbiología clínica. En años recientes, este campo de estudio se ha expandido grandemente debido a la preocupación creciente acerca de la importancia que tiene el realizar una identificación precisa del agente patógeno para proporcionar un tratamiento adecuado al paciente. Los laboratorios clínicos son generalmente capaces de aislar, identificar, y determinar la sensibilidad a los antibióticos de las bacterias patógenas encontradas de manera rutinaria en un lapso de tiempo de 72 horas después de recibir la muestra. Sin embargo, los avances recientes en los métodos de diagnóstico rápido han hecho posible realizar la identificación de algunos agentes patógenos en menos de un día. Los métodos de diagnóstico que se basan en la inmunología o en la biología molecular han reducido aún más el tiempo necesario para llevar a cabo el diagnóstico, y en muchos casos un agente patógeno puede ser identificado sin tener que realizar el cultivo del mismo. Así, el papel del laboratorio de microbiología ha cambiado en los últimos años, pasando de servir sólo para confirmación del diagnóstico establecido por el clínico a guiar al médico en el diagnóstico y en la elección de la terapéutica.<sup>9,14</sup>

Cuando el médico, con base en un examen cuidadoso del paciente, decide que se encuentra presente una enfermedad infecciosa, es necesario coleccionar muestras de tejidos o fluidos infectados para realizar los análisis microbiológicos, inmunológicos y/o de biología molecular (Fig. 2). Dependiendo del tipo de infección, las muestras coleccionadas pueden incluir sangre, orina, heces, esputo, líquido cefalorraquídeo ó pus, las cuales deberán ser tomadas en condiciones asépticas para evitar el riesgo de contaminación y poder realizar la marcha de identificación sin temor a obtener resultados erróneos.<sup>14</sup>

Como puede observarse, la microbiología clínica consiste en una disciplina cualitativa que precisa de una interpretación subjetiva. En vez de monitorear los valores normales, que cambian durante la enfermedad y vuelven a la normalidad como consecuencia del tratamiento y/o recuperación, como ocurre en la bioquímica o en la hematología, la microbiología dirige sus intentos hacia el aislamiento de un agente patógeno, a menudo en zonas colonizadas por flora normal, en donde las variables de la recolección de muestras y su transporte, selección y utilización de medios adecuados de aislamiento, condiciones de incubación, criterios de identificación, determinación de la sensibilidad antimicrobiana y métodos de comunicación forman parte de las posibles fuentes de error que pueden determinar que la información proporcionada sea irrelevante o que conduzca a confusiones. Un programa para asegurar la calidad en microbiología clínica debe tener en cuenta todos estos aspectos, de tal modo que los límites de exactitud y reproducibilidad de los métodos microbiológicos puedan ser determinados y mantenidos a niveles que proporcionen datos de confianza y consistentes de información diagnóstica a costes razonables.<sup>15,16</sup>

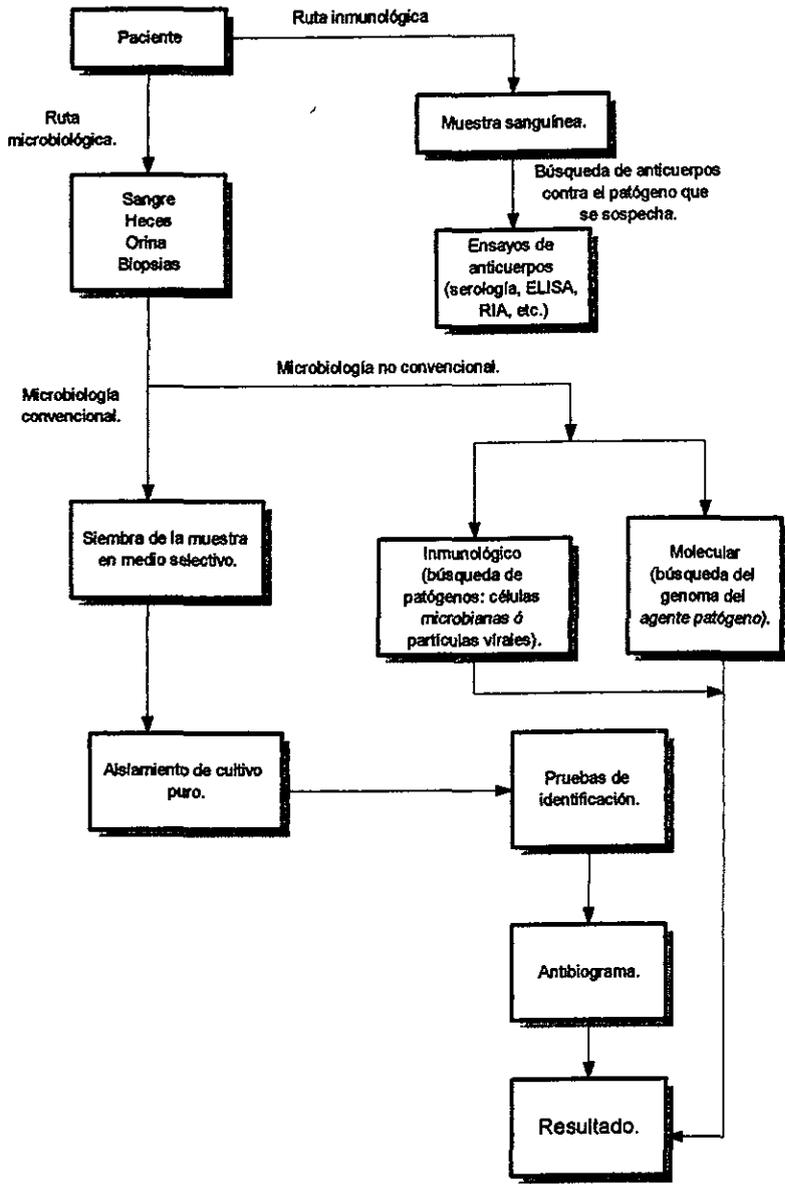


Figura 2 Distintas fases del procesamiento de una muestra en el laboratorio de bacteriología en las que se pueden producir errores. Tomado de: Brock D, Madigan T, 1988.

Las áreas a considerar al planificar un programa para asegurar la calidad de un modo completo son:

1. Personal: Debido al alto nivel de interpretación subjetiva requerido en casi cada nivel en el procesamiento de los especímenes remitidos para su valoración microbiológica, las calificaciones, la experiencia y las motivaciones del personal deben ser del mayor nivel. El personal debe ser estimulado a que tome parte en reuniones y seminarios y que lea literatura actual acerca de la microbiología clínica. Los libros de referencia al día, así como revistas adecuadas, han de encontrarse en la biblioteca del laboratorio.<sup>15</sup>

2. Documentación de los procedimientos: Para poder desarrollar un programa de control de calidad completo, el primer paso es el establecimiento de un manual detallado de los procedimientos. En este manual se incluirá toda la reglamentación que guiará la labor del laboratorio.<sup>15</sup>

3. Áreas específicas del control de calidad.

a) Medios de cultivo. El control de calidad cubrirá los aspectos de preparación adecuada de los medios de cultivo, esterilidad, funcionalidad y caducidad de los mismos para que puedan ser utilizados en el laboratorio clínico.<sup>9,15,17</sup>

b) Reactivos: Los reactivos utilizados en los laboratorios de microbiología incluyen colorantes, productos químicos y antimicrobianos, discos o tiras de papel impregnados y antisueros. Todos deben ser controlados para obtener resultados correctos. Antes de su uso hay que realizar pruebas de la función de cada lote, así como a intervalos adecuados durante la vida de ese lote. Estos intervalos dependen de la estabilidad inherente del reactivo o colorante, y de la frecuencia de su utilización.<sup>15</sup>

c) Análisis y pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Las pruebas de sensibilidad frente a los antibióticos y quimioterápicos o antibiogramas, constituyen posiblemente el punto de máxima responsabilidad de un laboratorio de microbiología. Por ello, es de capital importancia antes de establecer un control de calidad, que el laboratorio esté seguro de que ejecuta la técnica correctamente, comprobando meticulosamente todos y cada uno de los pasos del proceso. Los discos para probar la sensibilidad frente a los antimicrobianos deben guardarse y utilizarse cuidadosamente una vez recibidos en el laboratorio, sin sobrepasar la fecha de caducidad marcada por el fabricante.<sup>15,17</sup>

d) **Utillaje:** Es esencial poseer un equipo que funcione correctamente. Un programa de control de calidad debe incluir el control habitual de todos los aparatos mecánicos y eléctricos controlados por temperatura. Se han de establecer programas de conservación preventiva de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes del utillaje. Un manual de mantenimiento en el que estén especificadas la frecuencia y naturaleza del mantenimiento debe estar fijado o colocado cerca de cada pieza del equipo. Éstas deben revisarse periódicamente para estar seguros de que se ha realizado la puesta a punto necesaria y se han corregido los defectos encontrados. El manual de mantenimiento tiene que definir claramente quien es el responsable de la conservación de cada instrumento. El material de vidrio utilizado en el laboratorio debe ser inspeccionado, y las piezas descantilladas o resquebrajadas deben ser eliminadas. Los utensilios de vidrio han de estar libres de detergentes. Los instrumentos volumétricos de vidrio, especialmente las pipetas, se someterán a un procedimiento de control habitual para verificar la exactitud de su calibrado.<sup>17</sup>

e) **Microorganismos patrón, obtención y conservación:** Es necesario poseer una colección de cepas patrón que cumplan las características típicas morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y serológicas de la especie a que pertenecen para el control de los medios, reactivos y técnicas de identificación y prevenir los errores necesarios. Los microorganismos patrón se pueden obtener de distintas fuentes, por ejemplo: 1) The American Type Culture Collection (ATCC), 2) The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), y 3) laboratorios de referencia o laboratorios de salud pública.<sup>9,15</sup>

4. **Determinación de la eficacia.** El análisis de la eficacia, requerido por ciertas agencias del gobierno y algunas agencias privadas acreditativas o de verificación, proporciona un valioso complemento al programa del laboratorio para el control de calidad como medio de juzgar la calidad global.<sup>21</sup>

Finalmente, los resultados de los programas de análisis internos y externos deben ser revisados de modo regular y comentados con el personal. Estas discusiones han de constituir un ejercicio educativo en el que se haga hincapié en los resultados del laboratorio y del personal.<sup>15</sup>

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El poder identificar en un laboratorio de microbiología clínica al agente patógeno causante de una enfermedad infecciosa es muy importante, ya que por medio de una identificación correcta se puede determinar el tratamiento más adecuado a dicha infección; así, cuando se toma una muestra en el laboratorio, se tiene que seguir un proceso adecuado de manejo de dicha muestra, desde realizar la tinción de Gram, y la siembra de la muestra en diferentes medios de cultivo no selectivos y selectivos seleccionados de acuerdo al tipo de muestra con la que se esté trabajando ( exudado oral, nasal, ótico, orina, heces ), esto se hace con la finalidad de realizar un aislamiento primario del posible agente causante de la infección, posteriormente, se procede a realizar las pruebas de identificación ó pruebas bioquímicas (prueba de la catalasa, coagulasa, producción de indol, asimilación de carbohidratos, etc.), para así conocer con certeza el tipo de agente patógeno causante de la enfermedad, tanto en género como en especie; finalmente, se realiza la prueba de sensibilidad a antibióticos (antibiograma), por medio del cual se puede determinar a que tipo de antibióticos es más susceptible el microorganismo causal, y así, el médico pueda emitir el tratamiento más adecuado con base en los resultados proporcionados por el laboratorio de microbiología clínica. Como se puede observar, todas y cada una de las pruebas que se realizan durante el manejo de la muestra son de vital importancia para así poder emitir un resultado correcto, y en vista de que en cada una de las etapas es posible proporcionar resultados erróneos debido a equivocaciones por parte del analista, dichas pruebas deben ser llevadas a cabo con mucho cuidado, siguiendo paso a paso los métodos y las técnicas, de los cuales, el microbiólogo debe estar seguro que son en realidad confiables y que cumplen satisfactoriamente con la finalidad para la que fueron diseñados, es decir, los métodos deben estar validados, es por esta razón, que es importante y necesario desarrollar en todos los laboratorios, no sólo de índole farmacéutica, sino también clínicos, un programa integral de control de calidad, además de realizar conjuntamente la validación de los métodos que se utilizan en dichos laboratorios. Desgraciadamente, el control de calidad y la validación son aspectos relativamente nuevos en el área clínica y lo son aún más en el caso específico del área de microbiología, la cual es de suma importancia en el área diagnóstica de la salud, es por esto que surge la necesidad de comenzar a implantar programas de control de calidad en esta área, así como validar los métodos que se utilizan, desde las tinciones hasta la realización de los antibiogramas. En el caso específico del área de microbiología de los laboratorios de análisis clínicos de las Unidades Multidisciplinarias de Atención Integral (U.M.A.I.'s) de la F.E.S. Zaragoza, no se había seguido hasta la fecha un programa estricto de control de calidad como se hace en las otras áreas de dichos laboratorios, es por esto que fue importante realizar la implementación de dicho programa a fin de obtener resultados confiables y de calidad en ésta, con la ventaja de que este programa pueda ser implementado en cualquier laboratorio de primer nivel de atención que realice identificaciones microbianas.

## JUSTIFICACIÓN:

En los años recientes se han desarrollado técnicas que han cambiado substancialmente a los laboratorios de microbiología, de manera que ahora existen procedimientos bien estandarizados en la mayoría de las áreas (identificación de agentes, exámenes de sensibilidad antimicrobiana, cultivos anaerobios, etc.). Esta mejora ha afectado positivamente la calidad de análisis que, a su vez, ha avanzado de ser una sencilla confirmación del diagnóstico a una herramienta valiosa para confirmar la etiología de una infección, y, en la mayoría de los casos, proporciona una guía esencial para definir la terapia. Para obtener resultados exactos se requiere de una calidad alta, lo que fuerza al laboratorio a mantener un programa de control interno de calidad estructurado, exacto y periódico y que se complemente con un programa de evaluación externa de calidad. Así, al validar los métodos utilizados en el laboratorio, e implementar un programa integral de control de calidad, se obtiene la confianza de que el trabajo que se está realizando es de calidad, es decir, en primer lugar, los métodos y técnicas empleadas están cumpliendo de manera satisfactoria con las especificaciones y fines para lo que fueron diseñados; segundo, al trabajar dichos métodos no se presentarán alteraciones en los resultados que pongan en peligro la salud del paciente, quién es en primera instancia la persona que sufre de manera directa los posibles errores que se presenten al desarrollar un diagnóstico de laboratorio; tercero, los resultados obtenidos serán de calidad, es decir, serán confiables, reproducibles y con un margen de error casi nulo.

## **OBJETIVO GENERAL :**

Establecer un Programa Integral de Control de Calidad en el área de microbiología clínica para los laboratorios de análisis clínicos de las U.M.A.I.'s de la F.E.S. Zaragoza, aplicable a cualquier laboratorio de primer nivel de atención.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS :**

1. Conocer los principales factores que afectan la calidad de los resultados en el área de microbiología clínica.
2. Conocer y aplicar las medidas preventivas y correctivas que aseguren la calidad de los resultados en el área de microbiología clínica.
3. Realizar el control de las condiciones ambientales del área (humedad y temperatura) de microbiología.
4. Realizar el control y plantear recomendaciones prácticas para mejorar el lavado del material que se utiliza en el laboratorio de microbiología.
5. Demostrar la ausencia de sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento microbiano en el agua, que emplea un laboratorio de microbiología clínica.
6. Desarrollar el protocolo de control de calidad de materiales y equipo (incubadora, autoclave, etc.), de uso común en el laboratorio de microbiología clínica.
7. Recomendar procedimientos y protocolos para la recepción, preparación, y control de calidad de los medios de cultivo y reactivos que se utilizan comúnmente en el área de microbiología.
8. Recomendar procedimientos y protocolos para la preparación y control de calidad de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.
9. Realizar la validación de medios de cultivo y antibiogramas utilizados en el área de microbiología clínica.

## **HIPÓTESIS :**

Si se realiza la validación de los medios de cultivo y antibiogramas utilizados en el laboratorio de microbiología clínica, y además se establece en dicha área un programa integral de control de calidad que abarque desde la redacción de los documentos necesarios, hasta la realización de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, entonces, se podrán obtener resultados de alta calidad, es decir, confiables, reproducibles y con un pequeño margen de error, además de que se comprobará que las técnicas y métodos utilizados cumplan satisfactoriamente con la finalidad para la que fueron diseñados.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **1.- Documentación de los procedimientos.**

Con la finalidad de que el laboratorio desarrolle sus funciones correctamente y con precisión, dentro de un marco de bioseguridad, se escribieron los manuales de procedimientos, control y validación, donde se guardará toda la información necesaria (humana y técnica), para el buen desarrollo de todas las actividades. Los manuales incluyen básicamente los siguientes aspectos:

#### **a) Manual de procedimientos:**

- Descripción de los esquemas y fórmulas de preparación de medios de cultivo, reactivos y colorantes utilizados en el laboratorio de microbiología.

- Descripción detallada de las pautas de procesamiento de los distintos tipos de muestras. Comprende los efectuados siguiendo métodos directos y los efectuados siguiendo métodos indirectos o serológicos.

- Descripción detallada de cómo desarrollar los informes de salida de resultados tanto si se efectúan manualmente, como por computadora.

- Descripción de la normativa de seguridad en caso de incendio, o de cualquier otra situación de emergencia (salpicaduras con ácido, pinchazo accidental con una aguja, contacto de una mucosa con un suero, derrame de una suspensión bacteriana, etc.).

#### **b) Manual de control y validación:**

- Lista actualizada de todos los medios de cultivo, reactivos y colorantes utilizados, con los siguientes datos: tipo de medio, colorante o reactivo, personal que lo recibe, procedencia, fecha de entrada, fecha de caducidad.

- Descripción de los procedimientos de control de calidad y validación, explicando de forma breve el fundamento de cada procedimiento.

- Hojas de registro especiales para anotar los resultados de los diferentes procesos de control de calidad y validación realizados en el laboratorio.

El director del laboratorio es responsable de que el personal que trabaja en el mismo, conozca a fondo el contenido del manual de consultas, normas y esquemas, ya que un dominio de las técnicas profesionales y una mayor seguridad en el trabajo, conduce a un aumento de la calidad.

## **2.- Control de Calidad de Rutina.**

Se estableció un Programa de Control de Calidad de Rutina que cubrió los siguientes puntos:

### **a) Condiciones ambientales.**

- Control de temperatura.

Material: Termómetro.

Hoja de registro de temperaturas (fig. 3)

Procedimiento: Revisar diariamente la temperatura del cuarto, tanto al comienzo, como al final de la jornada de trabajo, anotando la temperatura y la hora de revisión de la misma en una hoja de registro de temperaturas.

### **b) Limpieza y desinfección.**

- Superficies de trabajo.

Material: Lienzo limpio

Detergente aniónico

Solución de fenol al 10%

Procedimiento: Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo por lo menos una vez al día al iniciar y terminar el trabajo, y tantas veces como sea necesario, y cuando se contaminen con un producto biológico. Frotar la superficie de trabajo suavemente utilizando un lienzo limpio humedecido en detergente haciendo movimientos circulares; posteriormente, remover el detergente usando un lienzo humedecido con agua de la llave; finalmente, desinfectar la superficie, colocando un poco de solución desinfectante sobre la superficie de trabajo y frotando con movimientos circulares utilizando un lienzo limpio. Los desinfectantes más apropiados son el fenol al 10% y el hipoclorito sódico a dosis de 5 g/litro ( 5000 ppm de cloro libre ). Si el producto es sospechoso de contener virus de la hepatitis, es mejor emplear formol al 5% o glutaraldehído al 2%.

La limpieza de los suelos se realiza utilizando un detergente aniónico y después aplicando hipoclorito sódico al 0.1% de cloro libre, es decir 1 g/litro ( 1000 ppm ).



- Eliminación de desechos biológicos.

Material : Olla de presión o autoclave.  
Mechero Fisher.  
Tripie.

Procedimiento: Esterilizar los productos biológicos antes de ser desechados. La esterilización se realiza en una olla de presión o autoclave a 120°C, a 15 libras de presión, durante 15 minutos. Una vez esterilizados los productos biológicos, son desechados en una bolsa de plástico cerrada y colocada en el depósito de basura biológico-infecciosa<sup>41</sup>.

c) Equipo.

- Congelador.

Material: Termómetro de inmersión parcial de -10 a 120° C.  
Hoja de registro de temperaturas.

Procedimiento: Registrar la temperatura diariamente al inicio y al final de la jornada de trabajo, anotándose la hora en que fue registrada. Introducir el termómetro dentro del congelador y esperar por lo menos 10 minutos para que la lectura se estabilice y así evitar errores de registro de la misma.

Descongelar y asear el congelador cada 6 meses.

- Refrigerador.

Material. Termómetro de inmersión parcial de -10 a 120° C.  
Hoja de registro de temperaturas.  
Vaso de precipitados de 100 mL.

Procedimiento: Registrar la temperatura diariamente al inicio y al final de la jornada de trabajo, anotándose la hora en que fue registrada. Llenar un vaso de precipitados con agua de la llave e introducirlo en el refrigerador, esperar por lo menos media hora para que la temperatura del agua se estabilice con la temperatura del refrigerador antes de proceder a checarla. Transcurrido el tiempo de espera, introducir el termómetro en el agua del vaso de precipitados y anotar la temperatura en la hoja de registro.

La limpieza del refrigerador debe hacerse mensualmente.

- Estufa.

Material: Termómetro de inmersión parcial de -10 a 120° C.  
Hoja de registro de temperaturas.

Procedimiento: Registrar la temperatura diariamente al inicio y al final de la jornada de trabajo, anotándose la hora en que fue registrada.

Limpiar la estufa mensualmente.

- Microscopio.

Material: Papel seda.

Procedimiento: Limpiar el microscopio cada vez que se utilice empleando papel seda para evitar que se dañen los lentes. Cubrir los oculares con una tapa apropiada cuando el microscopio no se utilice. Cubrirlo con una funda al finalizar la jornada de trabajo.

Comprobar el alineamiento del condensador mensualmente, efectuar una revisión general del aparato cada 6 meses.

- Autoclaves.

Material: Cinta testigo.

Cepa: esporas de *Bacillus stearothermophilus*.

Procedimiento: La relación tiempo-temperatura-presión es controlada para asegurarse que sea la adecuada para garantizar una total esterilización. Ello se consigue incluyendo entre el material a esterilizar una ampolleta que contenga una suspensión con esporas de *Bacillus stearothermophilus*, que es una bacteria altamente resistente al calor, se procede a realizar el ciclo de esterilización a 121° C, 15 lbs de presión durante 15 minutos. Se considera que la esterilización ha sido correcta si el microorganismo no puede ser subcultivado en un medio de enriquecimiento (agar sangre o chocolate) después de 24 horas de incubación a una temperatura de 37° C.

Otra forma de comprobar una correcta esterilización es el introducir, junto con el material a esterilizar, un trozo de cinta testigo. Se considera que la esterilización ha sido correcta si la cinta testigo presenta cambio de coloración.

El control de la olla de presión y de los autoclaves se lleva a cabo quincenalmente, y deben limpiarse una vez al mes.

### **3.- Etapas de Control de Calidad.**

#### **a) Control Preanalítico.**

- Registro del paciente: Registrar al paciente, anotando en la libreta general todos sus datos (*Nombre, clave, edad, sexo, procedencia, tipo de estudio*).

- Toma de muestra: Los estudios bacteriológicos para la confirmación del diagnóstico clínico en el área de las enfermedades infecciosas requieren de una buena toma de muestra biológica pues son la parte primordial de dichos estudios. Las tomas de muestra más comunes en el laboratorio y sus procedimientos son los siguientes:

##### *i) Exudado faringeo:*

Material: Abatelenguas.  
Hisopo estéril de algodón.  
Guantes  
Cubreboca

Indicación al paciente: Presentarse al laboratorio en ayunas, sin lavarse la boca, sin usar pasta dental o cualquier antiséptico local.

Colección de la muestra: Solicitar la apertura bucal, y utilizando guantes y cubreboca, se presiona la lengua hacia abajo con ayuda de un abatelenguas, introducir un hisopo estéril, sin tocar la lengua, saliva, ni la úvula y con un rápido movimiento, frotar la superficie de la orofaringe. Colocar el hisopo en medio de Stuart para poder realizar posteriormente la siembra del producto.

##### *ii) Exudado nasal.*

Material: 2 hisopos estériles.  
Guantes  
Cubreboca

Indicación al paciente: Presentarse en la mañana evitando el uso de gotas nasales de cualquier tipo.

Colección de la muestra: Utilizando guantes y cubreboca, introducir un hisopo estéril en cada fosa nasal, levantando la punta de la nariz y dirigiendo el hisopo hacia el ángulo interno del ojo, hasta sentir una ligera resistencia que debe ser vencida suavemente, se hace un movimiento de rotación del hisopo extrayéndolo con suavidad. Conservar el producto en caldo BHI durante media hora para favorecer el crecimiento de las posibles bacterias patógenas presentes en la muestra.

*iii ) Exudado ótico.*

Material: Hisopo estéril.  
Gasa estéril.  
Agua estéril.  
Guantes.

Indicaciones al paciente: Presentarse sin aseo del oído, sin usar pomadas ni soluciones óticas.

Colección de la muestra: Existen dos alternativas.

a) Si existe colección purulenta contenida en la membrana timpánica debe ser remitido al otorrinolaringólogo para que sea practicada una paracentesis y la muestra obtenida por aspiración.

b) Si existe colección purulenta a través del conducto auditivo externo debe limpiarse el pabellón auricular con gasa humedecida con agua y la parte más externa con un hisopo impregnado con agua ( la gasa, el agua y el hisopo deberán estar esterilizados ). Una vez absorbida el agua con la gasa se levanta el pabellón auricular hacia arriba y atrás para introducir suavemente un hisopo humedecido con caldo BHI a través del conducto hasta sentir resistencia, girar el hisopo y retirar con suavidad. Conservar en caldo BHI durante media hora para favorecer el crecimiento de las posibles bacterias patógenas presentes en la muestra.

*iv) Exudado vaginal.*

Material: 3 Hisopos estériles.	Solución de KOH al 10%
Espejo vaginal.	3 portaobjetos.
Guantes.	Papel indicador de pH.
Cubreboca.	Placa con agar chocolate.

Indicación al paciente: Presentarse al laboratorio en la mañana, bañada pero sin aseo vaginal interno, no usar óvulos ni haber tenido relaciones sexuales la noche anterior a la toma de muestra.

Colección del producto: Colocar a la paciente en posición ginecológica, la persona encargada de colectar la muestra debe utilizar guantes estériles. Al iniciar la toma de la muestra, separar los labios mayores con una mano, mientras se introduce el espejo vaginal sin lubricante con la otra mano, exponiendo el cuello uterino. Introducir tres hisopos tallando fondo de saco y cérvix; el primero se destina para el cultivo, el segundo para el examen en fresco, que se realiza en un período de no más de 15 minutos de tomada la muestra, y el tercero para el frotis que se hace rodando el hisopo lentamente sobre la laminilla para evitar destrucción de las células epiteliales.

Tomar el pH frotando el contenido de un hisopo contra la tira de papel pH, posteriormente, en un portaobjetos colocar una gota de solución de KOH al 10% y frotar el hisopo contra esa solución y acercarse el portaobjetos a la nariz para detectar el olor característico a "pescado podrido" que se presenta en el caso de infección por *Gardnerella vaginalis*. Efectuar una siembra directa de la muestra en una placa de agar chocolate para realizar la búsqueda de microorganismos exigentes y/o difíciles de cultivar. Todas estas observaciones se anotan en la libreta de registro.

v) *Urocultivo*.

Material: Frasco vacío, limpio y estéril.

Indicación al paciente: Realizar aseo previo en el área genital, recolectar el chorro medio de la primer orina de la mañana en un frasco estéril, y no tardar más de 2 horas en llevar la muestra al laboratorio.

Colección del producto: Entregar al paciente un frasco limpio, vacío, estéril. Se le indica que deberá lavarse la zona periuretral y el perineo con agua jabonosa de delante hacia atrás, y que una vez aseada esta región se deja correr la primera porción de la orina la cual se descarta y sin parar la micción, se colecta en el frasco estéril la porción media. Sembrar el producto tratando de que no transcurran más de 30 minutos.

vi) *Coprocultivo*:

Material: Envase limpio (no necesariamente estéril).

Indicación al paciente: Colectar la primera muestra fecal preferentemente de la mañana y entregarla al laboratorio no después de 1-2 horas de excretada.

Colección del producto:

Depositar de dos a tres gramos de materia fecal (muestra del tamaño de una nuez ) o de tres a cinco mililitros de evacuación diarréica en un envase perfectamente limpio. Sembrar las muestras inmediatamente al llegar al laboratorio, haciendo especial énfasis en el registro de la muestra, si corresponde a algún niño menor de un año.

## b) Control analítico.

### *i) Control de las tinciones.*

La funcionalidad de los colorantes para esta tinción se analiza después de su preparación y a intervalos de una semana, utilizando cepas de referencia ATCC.

Material: Portaobjetos.

Reactivos: Cristal violeta.

Lugol.

Solución Alcohol-Acetona 1:1

Safranina.

Cepas : *S. aureus* ATCC 25923.

*E. coli* ATCC 25922

\*ATCC= American Type Culture Collection.

Procedimiento: Colocar una gota de agua en el portaobjetos, después una asada del microorganismo control, homogeneizar la suspensión y fijar al calor.

Cubrir el frotis con cristal violeta durante un minuto, enjuagar con agua de la llave y cubrir con lugol durante otro minuto, enjuagar con agua de la llave.

Posteriormente, decolorar el frotis con la solución alcohol-acetona hasta que dicha solución no arrastre consigo más colorante. Finalmente, cubrir el frotis con safranina durante 20 segundos, para posteriormente enjuagarla con agua de la llave.

Dejar secar el frotis y observar al microscopio.

### *ii) Determinación de sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento microbiano en el agua destilada o desmineralizada.*

Aplicar la prueba a cada uno de los lotes de agua destilada que se emplean en el laboratorio para preparar medios de cultivo, diluyentes y reactivos para análisis microbiológicos y siempre que estas aguas provengan de sistemas de purificación recién instalados o sujetos a modificaciones que puedan alterar la calidad del agua.

Material: 3 Cubrebocas.

7 tubos de Folin-Wu con tapa de algodón.

20 Tubos de ensayo de 13x100 mm con tapa de algodón.

1 Matraz Erlenmeyer de 500 mL.

1 Matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenga 200 mL de agua destilada.

15 Cajas de Petri de 100x15 mm.

6 Pipetas graduadas de 5 mL.

2 Pipetas graduadas de 10 mL.

2 Pipetas graduadas de 2 mL.

12 Pipetas graduadas de 1 mL.

- 1 Pipetas serológica de 0.2 mL.
- 5 Frascos de vidrio color ambar.
- Asa bacteriológica

Nota: Antes de realizarse el estudio, todo el material se esteriliza en olla de presión a 121°C, durante 15 minutos, a 15 libras de presión.

Cepa de referencia: *Enterobacter cloacae* ATCC 23355.

Equipo: Espectrofotómetro.

Preparación de reactivos:

Usar reactivos de alta pureza y prepararlos con agua destilada, tomando como base para su preparación las cantidades siguientes.

A) Solución de citrato de sodio.

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.29 g.
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	500 mL.

B) Solución de sulfato de amonio.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.60 g.
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	500 mL.

C) Solución de mezcla de sales.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.26 g.
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.12 g.
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.23 g.
$\text{NaCl}$	2.50 g.
$\text{H}_2\text{O}$	500 mL.

D) Solución amortiguadora de fosfatos (concentrada) 0.25 M

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	34 g.
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	1000 mL.

En un matraz volumétrico de 1L disolver el fosfato en 500 mL de agua; ajustar el pH a 7.2+/-0.2 con NaOH 1N, aforar con agua destilada.

E) Solución amortiguadora de fosfatos (diluída)

En un matraz volumétrico de 1000 mL realizar una dilución 1:25 mL de la solución concentrada, aforar con agua destilada. Envasar las soluciones en los recipientes adecuados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Medios de Cultivo (para 1000 mL.)

**Caldo Infusión Cerebro Corazón (BIOXON)**

Infusión cerebro de ternera.....	200.0 gr.
Infusión de corazón de res.....	250.0 gr.
Peptona de gelatina.....	10.0 gr.
Dextrosa.....	2.0 gr.
Cloruro de sodio.....	5.0 gr.
Fosfato disódico.....	2.5 gr.
pH final 7.4 + 0.2	

**Caldo Soya-Tripticaséina (BIOXON).**

Peptona de caseína.....	17.0 gr.
Peptona de soya.....	3.0 gr.
Cloruro de sodio.....	5.0 gr.
Fosfato dipotásico.....	2.5 gr.
Dextrosa.....	2.5 gr.

**Agar Bacteriológico (BIOXON).**

Preparar y esterilizar los medios de cultivo siguiendo las indicaciones del fabricante (ver Apéndice).

**Procedimiento:**

- Siembra del microorganismo de prueba.

En un tubo de ensaye de 16x125 mm con tapón de rosca conteniendo caldo BHI, inocular una asada del microorganismo de prueba, e incubar durante 24 horas a 35°C, esto con el fin de obtener bacterias viables en fase de reproducción.

- Cosecha del microorganismo.

Transcurridas las 24 horas, ajustar la suspensión del microorganismo al 60% de transmitancia a 580 nanómetros, utilizando agua destilada estéril tanto como diluyente de la suspensión, como blanco para realizar las lecturas.

- Dilución de la suspensión bacteriana.

Diluir la suspensión bacteriana original hasta  $10^6$ , determinar por el método de vaciado en placa (usando agar soya-tripticasea), el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). Seleccionar aquellas diluciones que contengan entre 900 y 2400 UFC/mL.

- Recolección de la muestra de agua a probar.

En un matraz estéril depositar 150 mL del agua a probar, ponerla en ebullición durante 1 a 2 minutos (evitar la ebullición prolongada).

- Preparación de los tubos de prueba.

En condiciones de esterilidad y usando material estéril preparar los tubos de Folin-Wu como se indica en la siguiente tabla:

TUBO Solución	PRUEBAS				
	Control A	Control B	C	Opción D	Opción E
a) Citrato de sodio.	2.5 mL	2.5 mL	---	2.5 mL	---
b) Sulfato. de amonio	2.5 mL	2.5 mL	---	---	2.5 mL
c) Mezcla de sales.	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
d) Solución amortiguadora de fosfatos.	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Muestra de agua.	---	21.0 mL	21.0 mL	21.0 mL	21.0 mL
Agua bidestilada	21.0 mL	---	5.0 mL	2.5 mL	2.5 mL
Volumen total	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL	30.0 mL

donde:

A) Control de crecimiento del microorganismo de prueba.

B) Agua de prueba.

C) Demostración de fuentes de nitrógeno y carbono en el agua.

D) Demostración de fuentes de nitrógeno en el agua de prueba.

E) Demostración de fuentes de carbono en el agua de prueba.

- Inoculación de los tubos de prueba.

Inocular cada tubo con un volumen tal de la suspensión del *E. cloacae* de tal forma que cada tubo o matraz contenga de 30-80 UFC/mL. Incubar a 37°C durante 20-24 horas; determinar por el método de vaciado en placa el número de UFC/mL en cada tubo. Usar como medio de cuenta agar soya tripticasa.

Cálculos: Una vez obtenidos los resultados, realizar los siguientes cálculos de acuerdo a los criterios señalados en cada inciso.

- Relación 1: Determinación de sustancias inhibitorias.

$$\frac{\text{Recuento de UFC/mL en el tubo B}}{\text{Recuento de UFC/mL en el tubo A}} = \text{Proporción}$$

Una proporción de 0.8 a 1.2 indica ausencia de sustancias tóxicas. Una proporción menor a 0.8 indica presencia de sustancias inhibitorias del crecimiento en el agua.

- Relación 2: Determinación de sustancias nutritivas (fuentes de nitrógeno y carbono). Sólo se calcula cuando la proporción de la relación 1 es mayor a 1.2

$$\frac{\text{Recuento de UFC/mL en el tubo C}}{\text{Recuento de UFC/mL en el tubo A}} = \text{Proporción}$$

- Relación 3: Determinación de fuentes de nitrógeno que promueven el crecimiento. No se deben determinar si la relación 1 es menor a 0.8.

$$\frac{\text{Recuento de UFC/mL en el tubo D}}{\text{Recuento de UFC/mL en el tubo A}} = \text{Proporción}$$

- Relación 4: Determinación de fuentes de carbono que promueven el crecimiento. No determinarse si el resultado de la relación 1 es menor a 0.8

$$\frac{\text{Recuento de UFC/mL en el tubo E}}{\text{Recuento de UFC/mL en el tubo A}} = \text{Proporción}$$

Criterio de aceptación: El agua destilada se acepta o rechaza de acuerdo a los siguientes criterios:

- Si el resultado de la relación 1 es menor a 0.8 el agua presenta sustancias inhibitorias y no debe usarse para la preparación de medios de cultivo.
- Si el resultado de la relación 1 es mayor de 1.2 proceda a determinar presencia de sustancias promotoras del crecimiento.
- Si los resultados de las relaciones 2, 3 y 4 son positivos evite usar este tipo de agua.

Los resultados se reportan en una hoja de registro diseñada para tal propósito (Fig. 4).

### *iii) Control de los medios de cultivo.*

- Realizar un inventario de los medios de cultivo en existencia en el almacén, con base en primeras entradas y primeras salidas. Registrar en el inventario el nombre de los diferentes medios de cultivo, distribuidor, número de lote y fecha de caducidad.

- Registrar los datos generales de cada medio de cultivo en fichas de trabajo, en cada tarjeta, anotar el nombre del medio de cultivo, número de lote, fabricante, fecha de caducidad, formulación del medio, preparación indicada por el fabricante y preparación realizada según las necesidades del laboratorio .

- Preparar los medios de cultivo de acuerdo a las necesidades del laboratorio siguiendo las indicaciones del fabricante. Utilizar agua destilada y recipientes libres de detergentes y otros contaminantes químicos.

- Asegurar la garantía de utilización de los medios de cultivo, sometiendo parte del lote (10% de la cantidad total preparada) a cuatro tipos de control: Uno destinado a verificar el pH del medio (control de pH); otro destinado a verificar su esterilidad (control de esterilidad); otro destinado a comprobar que bacteriológicamente cumple los fines para los que está destinado (control de funcionalidad) y un cuarto relativo a su límite de utilización (control de caducidad). Todos los resultados se anotan en hojas especiales, diseñadas para llevar a cabo el registro de los controles de medios de cultivo y pruebas bioquímicas (Fig.5). Llevar a cabo los controles como se indica a continuación:

## Control de agua destinada a preparar medios de cultivo.

Fecha: \_\_\_\_\_

### I) Características generales del agua:

Aspecto: \_\_\_\_\_

pH: \_\_\_\_\_

Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### II) Desarrollo de UFC en las placas de prueba.

Placa A: \_\_\_\_\_

Placa B: \_\_\_\_\_

Placa C: \_\_\_\_\_

Placa D: \_\_\_\_\_

Placa E: \_\_\_\_\_

Conclusiones:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

VoBo: \_\_\_\_\_

Supervisó: \_\_\_\_\_

Fig.4 Hoja de registro para control del agua destilada.







### 1) Determinación del pH final del medio.

Material: Papel indicador de pH.

Vaso de precipitados de 50 mL.

Procedimiento: Una vez preparado el medio, tomar una pequeña porción en un vaso de precipitados, a la cual se le permite enfriar sin que llegue a solidificar. Posteriormente introducir una tira de papel indicador para así verificar el pH final del medio. Anotar el resultado en la hoja de registro (Fig. 5.2)

### 2) Control de esterilidad.

Equipo: Estufa.

Procedimiento: Incubar una parte equivalente al 10% de cada lote de elaboración en la estufa durante 48 horas a 37° centígrados para comprobar la ausencia de crecimiento. Si no hay crecimiento en el grupo control, se mantiene el resto del lote en el refrigerador hasta su utilización (suponiendo que pase el tercer control).

### 3) Control de funcionalidad.

Material: Asa bacteriológica.

Mechero Bunsen.

Cubre bocas.

Medio de cultivo: Caldo BHI.

Cepas de referencia ATCC:	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922.
	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315.
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 27853.
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923.
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228.
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615.
	<i>Candida albicans</i>	

Procedimiento: El 10% de cada lote de medios de cultivo se aparta para ser inoculado, por lo menos con dos microorganismos control característicos del citado medio, siendo uno como control positivo y otro como control negativo.

Para estandarizar el método, y para tener un número mayor de bacterias viables, las cepas patrón se incuban en caldo BHI durante una hora a 37° C, y se resiembran en una placa dividida en dos cuadrantes (un cuadrante para cada cepa control), utilizando un asa bacteriológica de 4 mm. de diámetro por agotamiento en estría cruzada, con el fin de conseguir un buen aislamiento. Incubar la placa inoculada durante 24 horas a una temperatura de 37°C; registrar los resultados en las hojas de registro. En la tabla I se exponen los posibles microorganismos de control, de algunos medios de cultivo de uso común.

**TABLA I.**  
Microorganismos de control de algunos medios de cultivo de uso común.

<b>MEDIO DE CULTIVO.</b>	<b>CONTROL POSITIVO.</b>	<b>CONTROL NEGATIVO.</b>
Sal - Manitol.	<i>S. aureus.</i>	<i>E. coli.</i>
PDA.	<i>C. albicans.</i>	Ninguno.
EMB.	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium.</i>	<i>S. aureus.</i>
Agar Sangre.	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i>	Ninguno.
Agar chocolate.	<i>E. coli</i> <i>P. vulgaris</i> <i>S. aureus</i>	Ninguno.
BHI.	<i>S. aureus</i>	Ninguno.
Müller-Hinton.	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Ninguno.

Modificado de Niño, H. (1993).

#### 4) Control de Caducidad.

Procedimiento: En el momento de emplacar los agares es preciso rotular de forma visible sobre cada placa, el nombre del medio de cultivo y la fecha de su preparación. De esta forma, será fácil identificarlo y conocer el tiempo que separa al gel de su límite de caducidad. En la tabla II se exponen datos sobre el tiempo de almacenaje de algunos medios de cultivo de uso común.

**TABLA II**  
Caducidad de algunos medios de uso común, almacenados en refrigeración y en bolsa de plástico.

<b>MEDIO DE CULTIVO</b>	<b>EN NEVERA A 4° C EN BOLSA DE PLÁSTICO</b>
Agar Sal- Manitol	60 Días
Agar PDA	50 Días
Agar EMB	70 Días
Agar Sangre	50 Días
Agar Chocolate	60 Días
Caldo BHI	180 Días
Agar Mueller- Hinton	60 Días
Agar SS	10 Días
Agar Sulfito-Bismuto	Usar inmediatamente
Agar verde brillante	Usar inmediatamente

Modificado de: Niño, H.(1993), Finegold, S. (1989) y Bernard, J. (1994).

Además de los cuatro controles mencionados anteriormente, se determina el índice de crecimiento absoluto (ICA) de los medios de cultivo siguiendo la siguiente técnica:

Material: Micropipeta de 1  $\mu$ L  
Puntas para micropipeta.

Medio de cultivo: caldo BHI.

Cepas de referencia: ver tabla I.

Procedimiento:

- Inocular los microorganismos a utilizar en 3 mL de caldo BHI durante 4 horas a 37°C.
- Dividir la placa del medio a ser probado en cuadrantes como se muestra en la Figura 6.
- Cargar la punta de la micropipeta con 1  $\mu$ L del cultivo de 4 horas.
- Sembrar la suspensión del microorganismo como se muestra en la Figura 6, de acuerdo al siguiente patrón: A1-B1-C1-D1-A2-B2-C2-D2-A3-B3-C3-D3-A4- etc.
- Sembrar una placa de agar sangre de manera similar, e incubar ambas placas a 37°C durante 24 horas.
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, visualizar el segmento al cual ha ocurrido el último crecimiento en ambas placas.
- Calcular el índice de crecimiento absoluto (ICA) asignando a cada segmento un valor índice para cada punto final de crecimiento de acuerdo a la siguiente tabla:

A1=05	B1=10	C1=15	D1=20
A2=25	B2=30	C2=35	D2=40
A3=45	B3=50	C3=55	D3=60
A4=65	B4=70	C4=75	D4=80
A5=85	B5=90	C5=95	D5=100

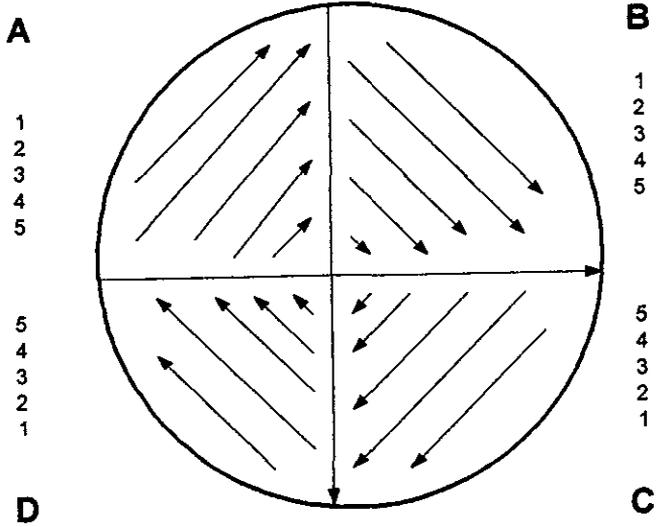


Fig. 6: Patrón para sembrar las placas de agar cuando se determine el Índice de Crecimiento Absoluto (ICA).

El ICA se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{índice del agar problema}}{\text{índice del agar control}} \times 100 = \text{ICA}$$

### ELECCIÓN ADECUADA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

- Dependiendo de la muestra a tratar y de los microorganismos que se desean recuperar, se eligen los medios de cultivo adecuados para realizar un aislamiento correcto (es recomendable utilizar por lo menos dos medios para aislamiento con diferente selectividad). En la tabla III se muestran los medios de cultivo más adecuados que se deben de utilizar dependiendo del tipo de muestra de que se trate, así como los principales microorganismos que se desean recuperar.

**TABLA III**

Medios de cultivo idóneos para la siembra de los diferentes tipos de muestras biológicas.

TIPO DE MUESTRA	MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMO QUE SE DESEA RECUPERAR
Exudado faringeo o nasofaringeo	Agar sangre	<i>S. pneumoniae</i> <i>S. pyogenes</i> (β-hemolítico)
	Agar sal-manitol Agar PDA	<i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i>
Exudado vaginal	Agar Chocolate	<i>Neisseria gonorrhoeae.</i> <i>Haemophilus ducreyi.</i> <i>G. vaginalis</i>
	Agar PDA	<i>C. albicans</i>
	Agar EMB	Enterobacterias
Urocultivo	Agar Sangre	Conteo de U.F.C.*
	Agar PDA	<i>C. albicans</i>
	Agar EMB	Enterobacterias
Coprocultivo	Agar EMB, Verde brillante, Sulfito-bismuto, S.S.	<i>Salmonella sp, Shigella sp</i> y <i>E. coli</i> (patógenas) principalmente.

Modificado de: P.L.M. (1993)

\*U.F.C.= Unidades Formadoras de Colonias.

- Los medios inoculados permanecen en incubación a 37°C durante 24 horas, en caso de presentarse crecimiento bacteriano se prosigue a la identificación del microorganismo y posteriormente se realizan las pruebas de sensibilidad microbiana.

iv) Control de calidad de las pruebas bioquímicas.

Los medios de cultivo mantenidos en tubo (entubados), están sometidos a los mismos controles que los medios emplacados, es decir, previamente deben pasar un control de esterilidad, después uno de calidad y finalmente, no sobrepasar un límite de caducidad.

El control de esterilidad se efectúa incubando durante 5 días a 35°C, un lote de tubos escogidos del grupo al azar, comprobando que al final no tienen crecimiento.

El control de calidad consiste en sembrar en cada tipo de medio, diferencial o de identificación, por lo menos dos microorganismos (uno como control positivo y otro como control negativo) con distinta actividad fisiológica o de crecimiento. En la tabla IV se detallan los microorganismos control que pueden emplearse para comprobar la calidad de algunos medios entubados incubados a una temperatura de 37°C.

**TABLA IV.**  
Microorganismos utilizados en el control de calidad de medios entubados (pruebas bioquímicas).

PRUEBA BIOQUÍMICA	MICROORGANISMO	CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO
Citrato de Simmons.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Escherichia coli</i>	24 h. aerobiosis.
Indol (Con R. de Kovacs).	<i>Escherichia coli</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 h. aerobiosis.
LIA (lisina-hierro).	<i>Salmonella typhimurium</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Shigella flexneri</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Proteus mirabilis</i>	24 h. aerobiosis.
MIO (Movilidad, Indol, Ornitina).	<i>Escherichia coli</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 h. aerobiosis.
TSI (Triple Azúcar Hierro)	<i>Shigella flexneri</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Citrobacter</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	24 h. aerobiosis.
Urea de Christensen.	<i>Proteus mirabilis</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Escherichia coli</i>	24 h. aerobiosis.
Voges Proskauer (con Rojo de metilo).	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24 h. aerobiosis.
	<i>Escherichia coli</i>	24 h. aerobiosis.

Modificado de: Niño, H.(1993).

El límite de caducidad de los medios en tubo es distinto según las condiciones de almacenamiento de los mismos. En la tabla V se exponen las posibles caducidades de un grupo de medios sólidos en tubo y almacenados en distintas condiciones, según temperatura y seguridad del cierre.

**TABLA V.**

Caducidad de algunos medios entubados, según temperatura y seguridad del cierre.

Agar Inclinado	Cierre no hermético.	Cierre no hermético.	Cierre hermético en bolsa de plástico.	Tapon de rosca sellado.
	4°C semanas.	T° ambiente semanas.	T° ambiente meses.	T° ambiente meses.
Agar Citrato de Simmons.	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Lisina Hierro.	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Movilidad Indol Ornitina.	3-4	1	2-4	2-4
Agar Triple Azúcar Hierro.	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Urea Christensen	3-4	1-2	2-4	3-6

Modificado de: Niño, H.(1993).

v) Control de Calidad de los Antibiogramas.

Material: 3 Placas con agar Mueller-Hinton.

3 Hisopos estériles.

Asa bacteriológica.

Mechero Bunsen.

Pinzas.

Caldo BHI.

Cepas de referencia ATCC : *S. aureus* ATCC 25923.

*E. coli* ATCC 25922.

*P aeruginosa* ATCC 27853.

Multidiscos grampositivos.

Multidisco gramnegativos.

**Procedimiento:** Utilizar únicamente agar Mueller-Hinton para realizar las pruebas de sensibilidad microbiana.

De acuerdo al tipo de sensidisco que se desee probar será el microorganismo que se inocule en la placa de agar; así, si se desea probar un lote de sensidiscos para microorganismos grampositivos inocular en la placa la cepa de *S. aureus* ATCC 25923, si por otra parte, se desea probar un lote de sensidiscos para microorganismos gramnegativos inocular las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Para estandarizar la técnica, tomar una asada de la cepa de referencia ATCC adecuada al tipo de sensidisco que se desea probar, inocular en caldo BHI e incubar durante una hora a 37° C.

Trabajando cerca de la flama del mechero y con ayuda de un hisopo estéril, sembrar masivamente la cepa de referencia en la placa de agar Mueller-Hinton. Posteriormente, colocar los sensidiscos sobre el medio utilizando, para esto, unas pinzas que hayan sido previamente esterilizadas a la flama del mechero.

La placa (correctamente rotulada con el tipo de microorganismo inoculado y el tipo de sensidisco a probar) incubar durante 24 horas a 37° C.; posteriormente comparar los diámetros de los halos de inhibición con los reportados por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) como estándar de referencia.

Anotar los resultados en la hoja de registro elaborada para este fin (Figs. 7, 7.1 y 7.2).

#### **vi) Validación de las pruebas de susceptibilidad a antibióticos (antibiogramas).**

Esta prueba se realizó no sólo con el fin de validar la técnica de la prueba que venía realizándose cotidianamente en el laboratorio, sino también, para poder compararla con otra técnica y, determinar cual de las dos era más confiable y por lo tanto, conveniente para su realización durante el trabajo de rutina.

**Material:** Por ensayo:

- 9 placas con agar Mueller-Hinton.
- 3 hisopos estériles.
- Asa bacteriológica.
- Mechero Bunsen.
- Pinzas.
- Caldo BHI.
- Tijeras.
- 2 tubos de 13x100mm con tapón de rosca.

Multidiscos para microorganismos grampositivos.

Lote N° : \_\_\_\_\_ Fecha de caducidad: \_\_\_\_\_  
 Fabricante: \_\_\_\_\_

Antibiótico:	Concentración.	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	
		Halo de inhibición (mm).	Halo de referencia (mm).
Ampicilina.	10 mcg.		27-35
Cefalotina.	30 mcg.		25-37
Cefotaxima.	30 mcg.		25-31
Ceftazidima.	30 mcg.		16-20
Cefuroxima.	30 mcg.		27-35
Dicloxacilina.	1.0 mcg.		N.R.*
Eritromicina.	15 mcg.		22-30
Estreptomicina.	10 mcg.		14-22
Gentamicina.	10 mcg.		19-27
Kanamicina.	30 mcg.		19-26
Lincomicina.	2.0 mcg.		N.R.
Pefloxacina.	5.0 mcg.		N.R.
Tetraciclina.	30 mcg.		19-28
Sulfametoxazol-trimetoprim.	25 mcg.		24-32
Penicilina.	10 U.		26-37
Otros.			

\*N.R. = No registrado.

VoBo= \_\_\_\_\_

Figura 7: Hoja de control para sensidiscos grampositivos.

Multidiscos para microorganismos gram negativos.

Lote N°: \_\_\_\_\_

Fecha de Caducidad: \_\_\_\_\_

Fabricante: \_\_\_\_\_

Cepa: *Escherichia coli*

ATCC: 25922

Antibiótico:	Concentración:	Halo de inhibición (mm).	Halo de referencia (mm).
Ac. nalidíxico.	30 mcg.		22-28
Ac. Oxolónico.	10 mcg.		N.R.*
Amikacina.	30 mcg.		19-26
Ampicilina.	10 mcg.		16-22
Carbencilina.	100 mcg.		23-29
Cefalosporina.	30 mcg.		18-23
Cefalotina.	30 mcg.		18-23
Cefotaxima.	30 mcg.		29-35
Ceftriaxona.	30 mcg.		29-35
Cloranfenicol.	30 mcg.		21-27
Colimicina.	10 mcg.		N.R.
Estreptomicina.	10 mcg.		12-20
Furadantina.	300 mcg.		20-25
Gentamicina.	10 mcg.		19-26
Netilmicina.	30 mcg.		22-30
Nitrofurantoína.	300 mcg.		20-25
Pefloxacina.	5 mcg.		N.R.
Sulfametoxazol-trimetoprim.	25 mcg.		24-32
Tetraciclina.	30 mcg.		18-25
Otros.			

\*N.R. = No registrado.

Figura 7.1. Hoja de control para sensidiscos para microorganismos gram negativos.

Multidiscos para microorganismos gram negativos.

Lote N°: \_\_\_\_\_

Fecha de Caducidad: \_\_\_\_\_

Fabricante: \_\_\_\_\_

Cepa: *Pseudomona aeruginosa* ATCC: 27853

Antibiótico:	Concentración:	Halo de inhibición (mm).	Halo de referencia (mm).
Ac. nalidixico.	30 mcg.		Resistente
Ac. Oxolónico.	10 mcg.		N.R.
Amikacina.	30 mcg.		18-26
Ampicilina.	10 mcg.		Resistente
Carbenicilina.	100 mcg.		18-24
Cefalosporina.	30 mcg.		Resistente
Cefalotina.	30 mcg.		Resistente
Cefotaxima.	30 mcg.		18-22
Ceftriaxona.	30 mcg.		17-23
Cloranfenicol.	30 mcg.		Resistente
Colimicina.	10 mcg.		N.R.
Estreptomicina.	10 mcg.		Resistente
Furadantina.	300 mcg.		Resistente
Gentamicina.	10 mcg.		16-21
Netilmicina.	30 mcg.		17-23
Nitrofurantoína.	300 mcg.		Resistente
Pefloxacina.	5 mcg.		N.R.
Sulfametoxazol-trimetoprim.	25 mcg.		Resistente
Tetraciclina.	30 mcg.		Resistente
Otros.			

\*N.R.= No registrado.

Figura 7.2. Hoja de control para sensidiscos para microorganismos gram negativos.

Reactivos: BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O al 1.75%.  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N (al 1%)  
Multidiscos y Unidiscos grampositivos.  
Multidiscos y Unidiscos gramnegativos.

Cepas de referencia ATCC : *S. aureus* ATCC 25923.  
*E. coli* ATCC 25922.  
*P. aeruginosa* ATCC 27853.

#### Procedimiento:

Al igual que en la prueba de control de calidad, utilizar únicamente agar Mueller-Hinton para realizar las pruebas de sensibilidad microbiana, y de acuerdo al tipo de sensidisco que se desea probar, es el microorganismo que se inocula en la placa de agar; así, si se desea probar un lote de sensidiscos para microorganismos grampositivos, se inocula en la placa la cepa de *S. aureus* ATCC 25923, si por otra parte, se desea probar un lote de sensidiscos para microorganismos gramnegativos, se inoculan en cajas separadas, las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. El procedimiento es el siguiente:

Preparación del inoculo: Transferir con asa bacteriológica de 3 a 4 colonias del microorganismo control a un tubo con 3-5 mL de caldo infusión cerebro-corazón, y hacer una suspensión de la bacteria en el caldo. Si la suspensión obtenida tiene una turbidez similar al tubo patrón (tubo 0.5 de la escala Mac-Farland) no es necesario una incubación ulterior; de lo contrario, los tubos inoculados se incuban a 37° C por un tiempo de 2-6 horas hasta lograr la turbidez requerida. Si es necesario diluir para igualar la suspensión a la del tubo patrón puede utilizarse caldo de cultivo o solución salina estériles.

Tubo Patrón: Su turbidez corresponde aproximadamente a  $1.5 \times 10^8$  microorganismos viables/mL. Preparar mezclando 0.5 mL de BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O al 1.75% con 99.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N (al 1%); agitar suavemente y se distribuyen 6-8 mL en tubos con tapa de rosca de 13x100 mm, conservar los tubos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Deben prepararse cada 6 meses.

Trabajando cerca de la flama del mechero, sumergir un hisopo de algodón estéril dentro de la suspensión preparada anteriormente, Descartar el exceso de líquido oprimiendo el hisopo contra las paredes del tubo, sembrar masivamente el inoculo en 3 placas con agar Mueller-Hinton.

En una de las cajas, con ayuda de las pinzas, previamente esterilizadas a la flama del mechero, colocar el anillo comercial de multidiscos sobre el agar, presionándolos suavemente para asegurar un buen contacto entre el disco y el medio de cultivo.

En las dos cajas restantes, colocar los unidiscos de forma individual , de tal manera que cada caja sólo contenga 6 sensidiscos, y no 12 como en el caso de la primer caja, para esto, los sensidiscos pueden separarse utilizando un par de tijeras, y unas pinzas, las cuales se esterilizan a la flama del mechero cada vez que se corta y coloca un sensidisco sobre la placa de agar. El orden de los sensidiscos es de acuerdo al presentado en el anillo comercial, para evitar alguna posible interacción por parte de loa antibióticos sí se llegará a modificar el orden.

Las placas (correctamente rotuladas con el tipo de microorganismo inoculado y el tipo de sensidisco a probar) se incuban durante 24 horas a 37°C; posteriormente se comparan los diámetros de los halos de inhibición con los reportados por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) como valores estándar de referencia.

Esta prueba se realiza en dos fases diferentes, la primer fase comprende la realización de la prueba en una serie de 6 ensayos, efectuados por el mismo analista bajo las mismas condiciones, esta fase es destinada para la determinación de la repetibilidad del sistema, la cual es una de las partes que conforman la precisión.

La segunda fase comprende la realización de la prueba en una serie de 12 repeticiones, llevadas a cabo por 2 analistas diferentes, en 2 días diferentes, haciendo cada analista 3 pruebas por día, es decir, llevar a cabo determinaciones independientes bajo condiciones diferentes (incluso se pueden utilizar diferentes lotes de sensidiscos), esta fase sirve para poder determinar la reproducibilidad del sistema, es decir, la concordancia entre las diferentes determinaciones, la cual conforma la otra parte que conforma la precisión del sistema.

### c) Control Postanalítico.

-Resultados: En cuanto al control de los resultados, deben seguirse las siguientes observaciones.

*Entregar los resultados únicamente al paciente o al médico.*

Anotar todas las observaciones que se consideren necesarias.

Entregar los resultados por escrito, con limpieza y claridad.

#### **4.- Análisis Estadístico.**

Se determinó la precisión de ambas técnicas para realizar antibiogramas (utilizando unidiscos y multidiscos), expresada tanto en repetibilidad como en reproducibilidad. En la determinación de la repetibilidad se calculó la media, desviación estándar, y coeficiente de variación para cada antimicrobiano, tanto para unidiscos como para multidiscos. Para la determinación de la reproducibilidad, se calculó, además de los parámetros antes mencionados, la correlación existente entre ambos analistas por medio de una *t de student*.

## RESULTADOS.

### 1. Documentación de Procedimientos.

Se redactaron los documentos necesarios para poder desarrollar un correcto Control de Calidad, es decir, los manuales, tanto de procedimientos como de Control y Validación de Métodos, se desarrollaron además las carpetas de registro de resultados y los inventarios de reactivos y medios de cultivo existentes en el laboratorio.

### 2. Control de Calidad de Rutina.

#### a) Condiciones Ambientales.

- Control de Temperatura Ambiental: Los resultados obtenidos a partir del registro diario de temperatura ambiental, se muestran en las gráficas 1 y 1.1.

#### b) Limpieza y desinfección.

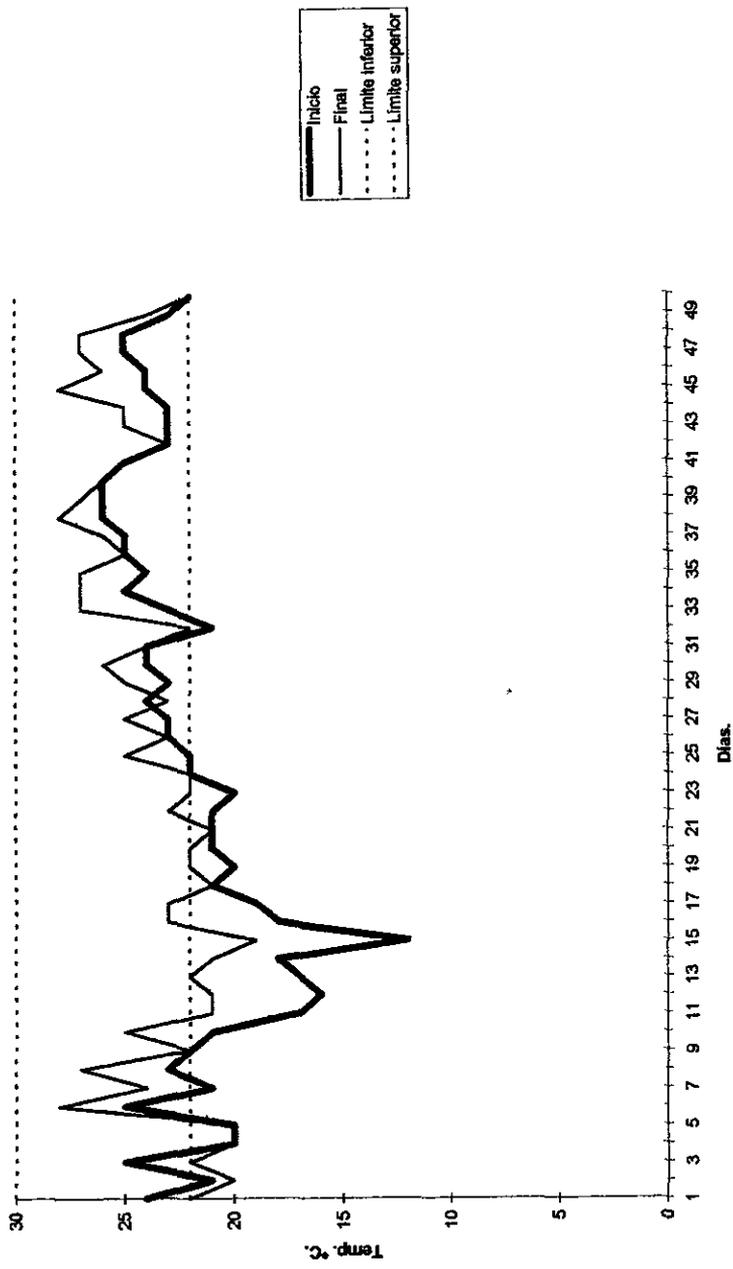
Estas se realizaron diariamente al inicio y al final de la jornada de trabajo, se utilizó como detergente benzal, y como agente desinfectante, fenol en solución al 10%.

#### c) Equipo.

Se realizó el control de temperatura de la estufa (incubadora), el congelador y dos refrigeradores (los cuales han sido designados como refrigerador 1 y 2), sus respectivos gráficos se muestran como se indica a continuación:

Equipo:	Gráfico:
Incubadora	2 y 2.1
Refrigerador 1	3 y 3.1
Congelador	4 y 4.1
Refrigerador 2	5 y 5.1

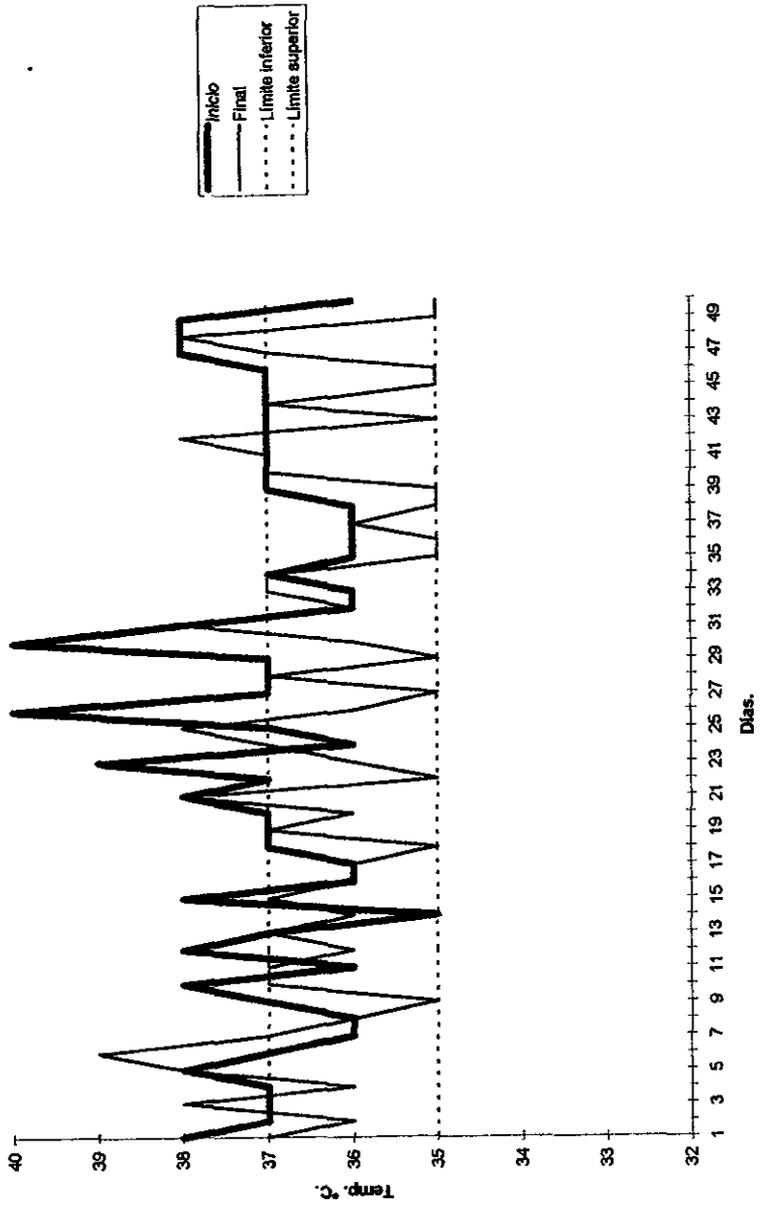
**Gráfico 1. Control de Temperatura Ambiental  
Noviembre 96 - Marzo 97**



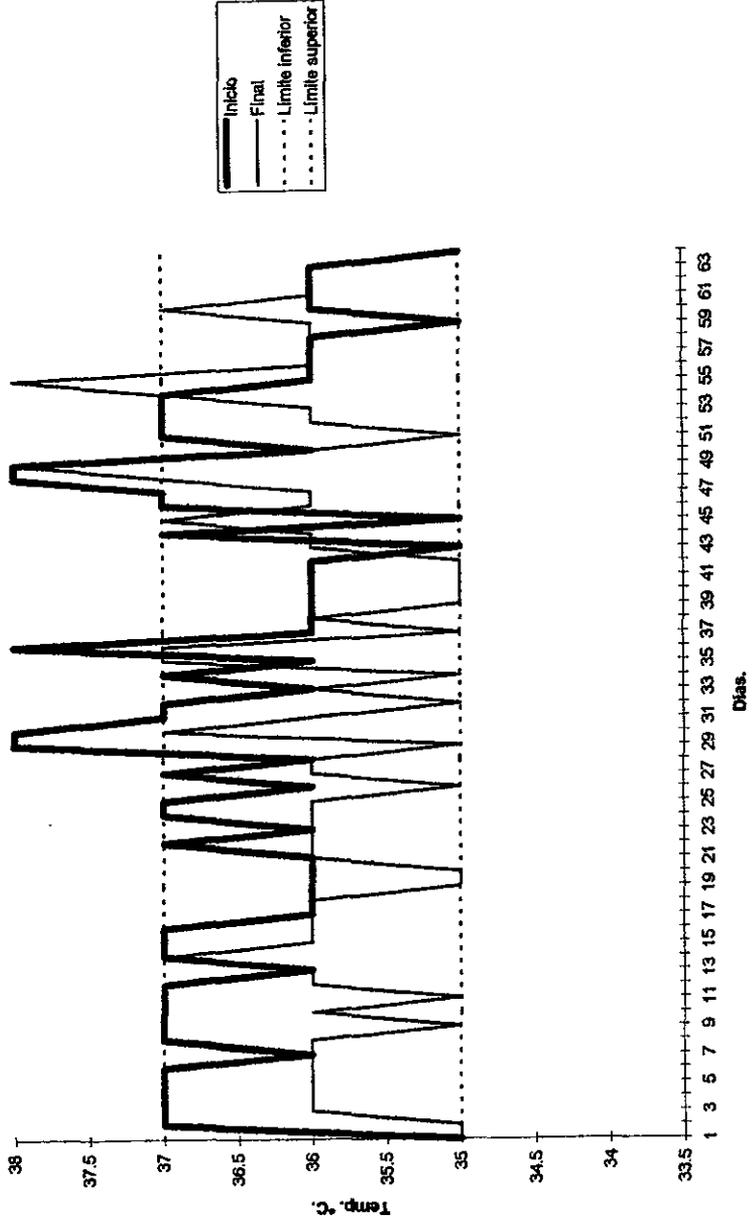
**Gráfico 1.1 Control de Temperatura Ambiental  
Abril 97 - Septiembre 97**



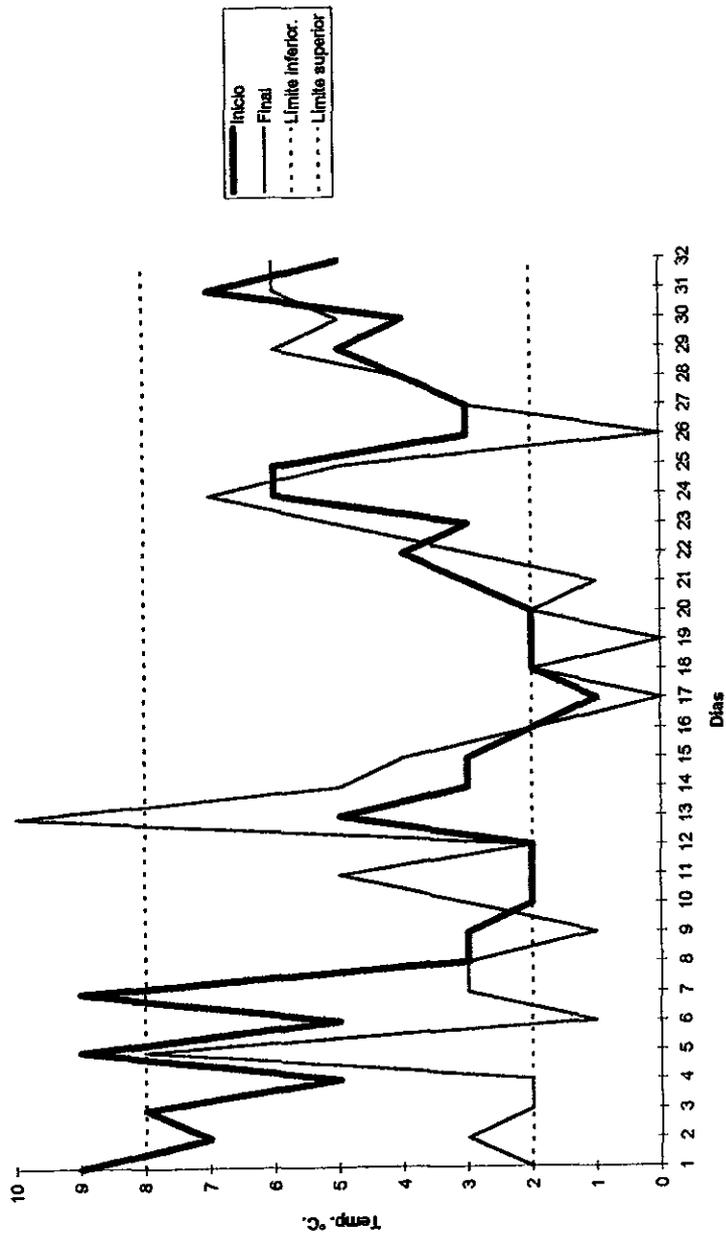
**Gráfico 2. Control de Temperatura de la Estufa.  
 Noviembre 96 - Marzo 97.**



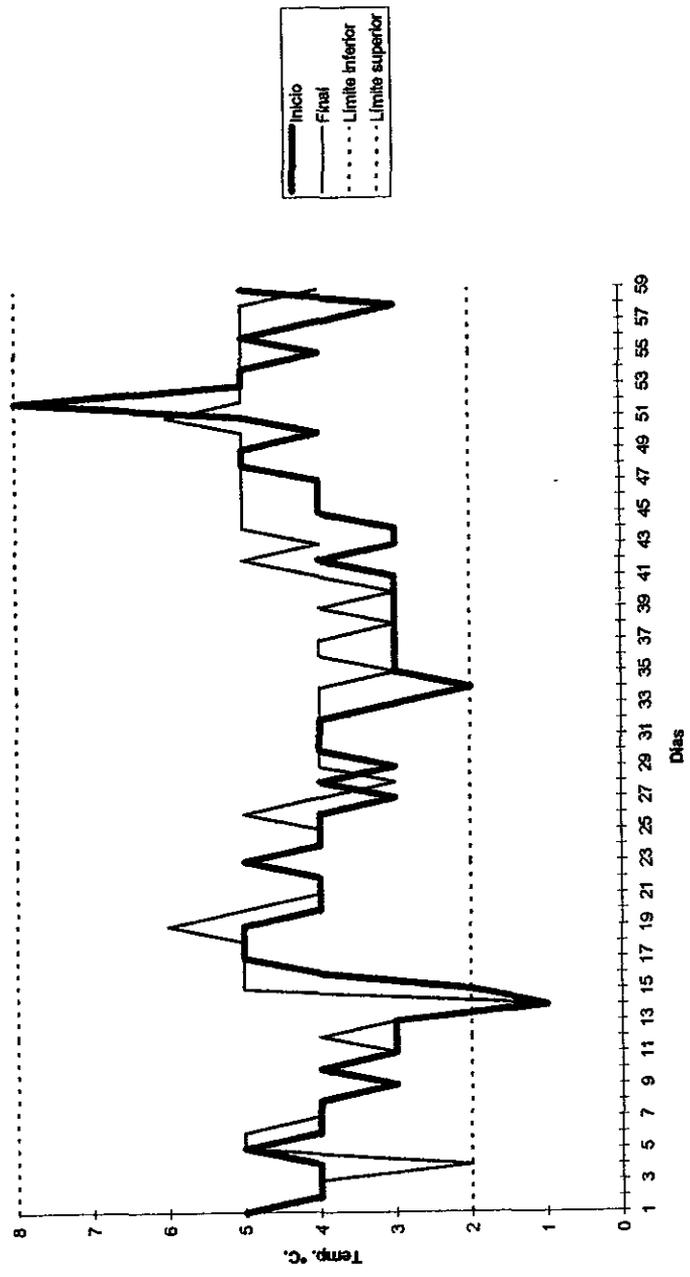
**Gráfico 2.1 Control de Temperatura de la Estufa  
Abril 97 - Septiembre 97**



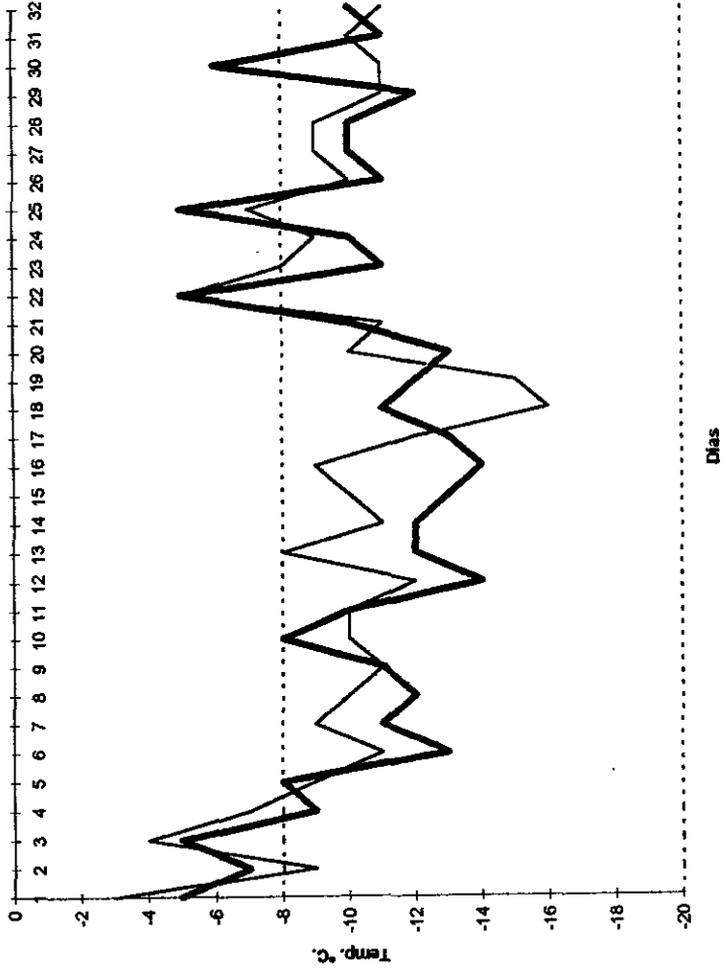
**Gráfico 3. Control de Temperatura del Refrigerador 1**  
**Noviembre 96 - Marzo 97**



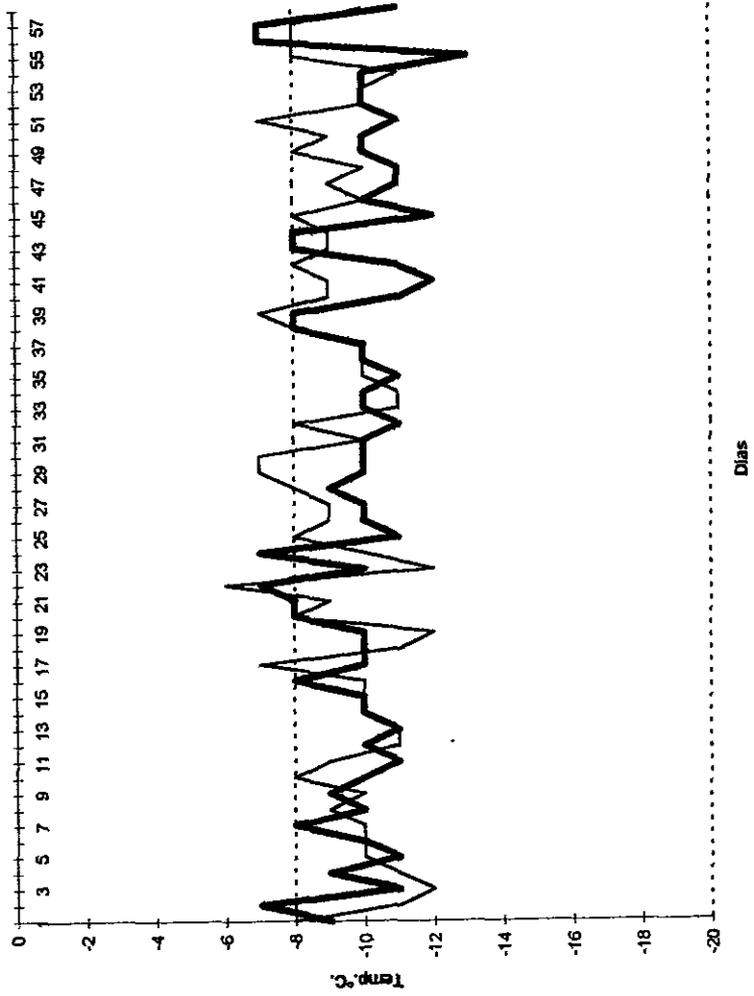
**Gráfico 3.1 Control de Temperatura del refrigerador 1  
Abril 97 - Septiembre 97**



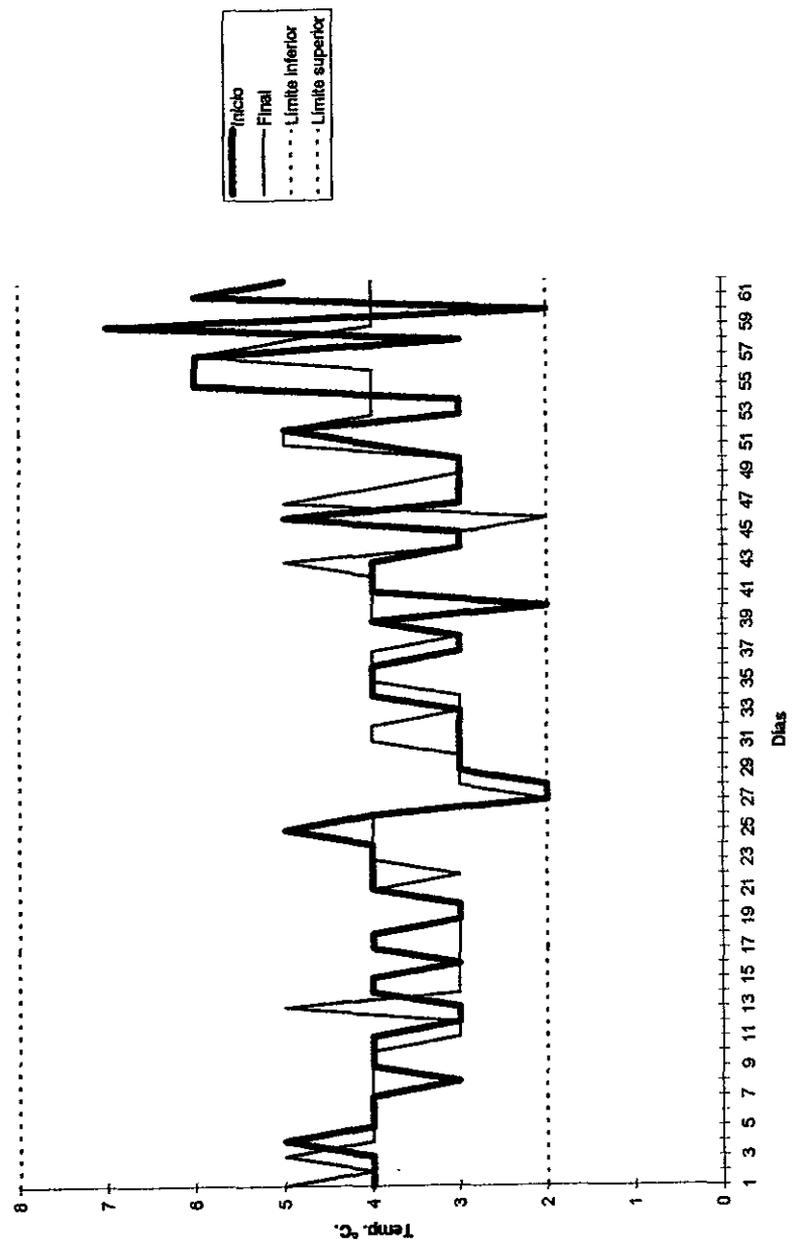
**Gráfico 4 Control de Temperatura del Congelador**  
**Noviembre 96 - Marzo 97**



**Gráfico 4.1 Control de Temperatura del congelador**  
**Abril 97 - Septiembre 97**



**Gráfico 5 Control de Temperatura del Refrigerador 2**  
**Abril 97 - Septiembre 97**



## 2. Etapas de Control de Calidad.

a) Determinación de sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento microbiano en el agua destilada o desmineralizada.

Se realizaron 3 determinaciones en total, una determinación por cada lote de agua destilada que ingresaba al laboratorio, los resultados de estas determinaciones se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1. Determinación de sustancias promotoras o inhibitorias del crecimiento microbiano en el agua destilada o desmineralizada.**

Determinación:	I.	II.	III.
Fecha:	9-Diciembre-1996	11-Marzo-1997	26-Mayo-1997
Aspecto del agua:	Incolora, inodora, Ausencia de partículas.	Incolora, inodora, Ausencia de partículas.	Incolora, inodora, Ausencia de partículas.
pH:	7	6 (se ajustó a 7 con NaOH).	5 (se ajustó a 7 con NaOH).
Desarrollo en: Placa A.	Incontable, se observan colonias individuales.	Incontable, se observan colonias individuales.	Incontable, no se observan colonias individuales.
Placa B.	Incontable, no se observan colonias individuales.	Incontable, se observan colonias individuales.	Incontable, no se observan colonias individuales.
Placa C.	Escaso, 800 UFC por mililitro.	No desarrolla.	Incontable, no se observan colonias individuales.
Placa D.	Incontable, se observan colonias individuales.	Crecimiento escaso, inhibido.	Incontable, no se observan colonias individuales.
Placa E.	Escaso, 700 UFC por mililitro.	No desarrolla.	Incontable, no se observan colonias individuales.
Conclusión.	Presencia de fuentes de nitrógeno, que promueven el crecimiento.	Ausencia de sustancias promotoras o inhibitorias.	Presencia de fuentes de nitrógeno y carbono, que promueven el crecimiento.
VoBo.	Rechazar lote.	Aceptar lote.	Rechazar lote

Cabe mencionar que cada determinación se realizó por duplicado para asegurar la calidad de los resultados.

b) Control de los Medios de Cultivo.

Los resultados finales del control de calidad de los medios de cultivo se muestran en la tabla 2, en ella se indican el medio de cultivo preparado, el número de lote del fabricante, el número de lotes preparados en el laboratorio así como el Visto Bueno final (VoBo) que se dió a los diferentes lotes.

**Tabla 2. Relación de los Medios de Cultivo a los que se les realizaron los diferentes controles de calidad.**

Medio de cultivo.	Número de lote del fabricante.	Número de lotes preparados.	VoBo. Final.
Medio de Stuart.	Se desconoce.	5	Todos los lotes fueron aceptados.
Infusión cerebro-corazón (BHI).	02D11231	9	Todos los lotes fueron aceptados.
Base para agar sangre.	05E20131	23	Todos los lotes, a excepción del lote número 3, fueron aceptados.
Agar de Mueller-Hinton.	14G11021	16	Todos los lotes fueron aceptados.
Agar de Mueller-Hinton.	14G11021	6	Todos los lotes fueron aceptados.
Agar Sal-Manitol.	07H14621	12	Todos los lotes fueron aceptados.
Agar Eosina-Azul de metileno (EMB).	11G10621	10	Todos los lotes fueron aceptados.
Agar Papa-Dextrosa (PDA).	14H11921	9	Todos los lotes fueron aceptados.

Como se puede apreciar, solamente un lote de agar sangre fue rechazado, esto fue debido a que la sangre utilizada estaba contaminada, presentándose crecimiento bacteriano en todo el lote preparado.

Los valores del control de pH se tomaron con base en el valor de pH final estipulado por el fabricante, y de acuerdo a éste, se procedía a rechazar o aceptar los diferentes lotes.

Durante el control de esterilidad, ningún lote (a excepción del lote 3 de agar sangre), presentó crecimiento bacteriano, por lo cual se procedió a aceptar todos lotes.

Para el control de funcionalidad, se tomaron en cuenta, ya fuera para aceptar o rechazar un determinado lote, los criterios que se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Resultados esperados al realizar el control de funcionalidad de los medios de cultivo de uso común en el laboratorio.**

Medio de cultivo.	Control Positivo.	Resultado Previsto.	Control Negativo.	Resultado Previsto.
Medio de Stuart.	<i>S. aureus</i> <i>E. Coli</i>	Recuperar cepas en Agar Sangre, después de 1 hora.	Ninguno	-----
Caldo BHI.	<i>S. aureus</i>	Enturbamiento de medio.	Ninguno	-----
Agar Sangre.	<i>S. Pyogenes</i>	Crecimiento, presencia de $\beta$ -hemolisis.	Ninguno	-----
Agar Chocolate.	<i>S. pyogenes</i>	Crecimiento, desarrollo abundante.	Ninguno	-----
Agar Mueller-Hinton.	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Desarrollo. Desarrollo.	Ninguno	-----
Agar Sal-Manitol	<i>S. aureus</i>	Colonias manitol positivas.	<i>E. coli</i>	No crece.
Agar EMB	<i>E. coli</i>	Colonias color verde metálico.	<i>S. aureus</i>	No crece.
Agar PDA	<i>C. albicans</i>	Desarrollo	Ninguno	-----

Modificado de: Niño,H.(1993) y Bernard,J. (1994)

En cuanto a la prueba del Índice de Crecimiento Absoluto (ICA), este no fue realizado con regularidad debido a la falta de una micropipeta de 1  $\mu$ L en el laboratorio, por lo cual sólo se pudo llevar a cabo esporádicamente.

Finalmente, ningún lote sobrepasó su límite de caducidad, por lo cual no hubo la necesidad de desechar ninguno de los lotes preparados.

c) Control de las Pruebas Bioquímicas.

A diferencia de los medios de cultivo, las pruebas bioquímicas no fueron preparadas con demasiada frecuencia, en la tabla 4, se muestran de manera global los resultados obtenidos durante el control efectuado a los lotes preparados en el laboratorio.

**Tabla 4. Relación de las pruebas bioquímicas a las que se les realizaron los diferentes controles de calidad.**

Prueba Bioquímica.	Número de lote del fabricante.	Número de lotes preparados.	VoBo.
Citrato de Simmons.	10F21632	6	Todos los lotes fueron aceptados.
Agar Lisina-Hierro (LIA).	05L13122	4	Todos los lotes fueron aceptados.
Agar Movilidad-Indol-Ornitina (MIO)	13K24161	6	Todos los lotes fueron aceptados.
Agar Triple Hierro Azúcar (TSI)	21127	5	Todos los lotes fueron aceptados.
Medio RM-VP	1079	5	Todos los lotes fueron aceptados.
Caldo Urea	13D21531	3	Todos los lotes fueron aceptados.

En este caso, todos los lotes fueron aceptados, al igual que en el caso de los medios de cultivo, el valor de pH se tomó a partir del estipulado por el fabricante, y con base en este, se aceptaba o rechazaba un lote; ningún lote presentó desarrollo después de los 5 días de incubación estipulado para el control de esterilidad, por lo cual todos los lotes fueron aprobados. Finalmente, los criterios que se tomaron en cuenta para el control de funcionalidad se muestran en la tabla número 5.

Ningún lote sobrepasó su límite de caducidad, por lo cual no existió la necesidad de desechar ningún lote ya preparado.

**Tabla 5. Resultados esperados al realizar el control de funcionalidad a las pruebas bioquímicas utilizadas en el laboratorio.**

Prueba Bioquímica	Control Positivo.	Resultado previsto.	Control negativo.	Resultado previsto.
Citrato de Simmons.	<i>K.pneumoniae</i>	Color azul (+)	<i>E. coli</i>	Color verde (-)
LIA.	<i>S.typhimurium</i>	Lisina (+) H <sub>2</sub> S (+)	<i>P. vulgaris</i>	Lisina (-) H <sub>2</sub> S (-)
MIO.	<i>E. coli</i>	Movilidad (+) Indol (+) Ornitina (+)	<i>K. pneumoniae</i>	Movilidad (-) Indol (-) Ornitina (-)
TSI.	<i>E. coli</i>	A/A, H <sub>2</sub> S (-)	<i>P. aeruginosa</i>	K/K, H <sub>2</sub> S (-)
Medio RM-VP	<i>E. coli</i> <i>K.pneumoniae</i>	RM (+) RM (+)	Ninguno	-----
Caldo Urea.	<i>P. vulgaris</i>	Color rosa (+)	<i>E. coli</i>	Color naranja (-)

Modificado de: Niño, H. (1993) y Bernard, J. (1994)

#### d) Control de Calidad de los Antibiogramas.

En este caso, se consideraron como valores de referencia, los halos de inhibición reportados por la NCCLS. Cada multidisco consta de 12 antibióticos diferentes, en el caso de que, más de 7 antibióticos presentarán un halo de inhibición que correspondieran con los halos de referencia. el lote era aceptado, en caso contrario se procedía a rechazar a rechazar o aceptar un determinado lote. En la tabla 6 se muestran los resultados de control de calidad realizado a los diferentes lotes de multidiscos tanto para microorganismos grampositivos, como para microorganismos gramnegativos.

**Tabla 6. Resultados del control de calidad realizado a los diferentes lotes de sensidiscos utilizados en el laboratorio.**

Fabricante	Número de lote.	Cepa de referencia	VoBo.
Sensidiscos para m.o. grampositivos.			
Bigaux Diagnóstica S.A.	09-92	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Rechazado
Bigaux Diagnóstica S.A.	12-92	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Rechazado
Sanofi Diagnostics Pasteur.	12-95	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Aceptado.
Sensidiscos para m.o. gramnegativos			
Bigaux Diagnóstica S.A.	02-87	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Rechazado
Sanofi Diagnostics Pasteur.	14-95	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Aceptado.

Los multidiscos defectuosos fueron desechados inmediatamente a fin de evitar el emitir resultados erróneos que pudieran comprometer la salud de los pacientes.

### e) Validación de los antibiogramas.

Se realizó la validación de los antibiogramas para sensibilizadores grampositivos y gramnegativos, determinando la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) del sistema, utilizando dos técnicas diferentes: 1) con multidiscos, y 2) con unidiscos, obteniendo los siguientes resultados:

#### 1) Sensibilizadores grampositivos.

Fabricante: Sanofi Diagnostics Pasteur.

Lote: MP 07-97

Cepa de referencia: *S. aureus* ATCC 25923.

Fecha de caducidad: 7 de Abril de 1998

#### 1.1. Determinación de la repetibilidad.

En las tablas 7 y 7.1 se observan los resultados obtenidos para los halos de inhibición, utilizando multidiscos y unidiscos respectivamente.

**Tabla 7. Resultados de los halos de inhibición (Multidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Ampicilina	19.1666	0.7527	3.9275
Cefalotina	20.0000	0.6324	3.1622
Cefotaxima	Sensible*	N.C.	N.C.
Ceftazidina	Resistente	N.C.	N.C.
Cefuroxima	Sensible*	N.C.	N.C.
Dicloxacilina	Resistente	N.C.	N.C.
Eritromicina	Resistente	N.C.	N.C.
Gentamicina	24.8333	0.7527	3.0312
Pefloxacina	Sensible*	N.C.	N.C.
Sulfametoxazol-Trimetoprim.	Sensible*	N.C.	N.C.
Tetraciclina	Resistente	N.C.	N.C.

X= media, D.E.= desviación estándar, C.V.= Coeficiente de variación, N.C.= No Calculado.

\* En el caso de los multidiscos, no es posible determinar los parámetros estadísticos, de cada uno de los antibióticos, ya que algunos halos, al unirse unos con otros, no pudieron ser leídos y no existen valores reales para estos.

La penicilina no se utilizó durante el estudio debido a que es un antibiótico al cual ya existen muchas cepas resistentes y por lo tanto se encuentra casi en desuso.

**Tabla 7.1 Resultados de los halos de inhibición (Unidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Ampicilina	19.6666	0.5163	2.6257
Cefalotina	18.1666	0.4082	2.2472
Cefotaxima	26.3333	1.2110	4.5989
Ceftazidina	9.0000	4.4721	49.6903
Cefuroxima	25.8333	0.7527	2.9139
Dicloxacilina	Resistente	N.C.	N.C.
Eritromicina	Resistente	N.C.	N.C.
Gentamicina	23.8333	0.4082	1.7129
Pefloxacina	23.8333	0.7527	3.1584
Sulfametoxazol-Trimetoprim.	33.1666	0.9831	2.9643
Tetraciclina	Resistente	N.C.	N.C.

### 1.2 Determinación de la reproducibilidad.

En las tablas 7.2 se muestra la correlación existente entre los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2, utilizando multidiscos.

**Tabla 7.2. Correlación existente entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 (multidiscos). Determinada por medio de un análisis de t de student.**

	Analista 1	Analista 2	Significancia.
Antibiótico.	X (+/- D.E.)	X (+/- D.E.)	P
Ampicilina	19.75 (+/- 0.95)	18.83 (+/- 0.40)	>0.05
Cefalotina	22.00 (+/- 1.87)	19.50 (+/- 0.54)	>0.05
Cefotaxima	Sensible	Sensible	-----
Ceftazidina	14.50 (+/- 1.22)	Sensible	-----
Cefuroxima	Sensible	28.16 (+/- 0.98)	-----
Dicloxacilina	Resistente	Resistente	-----
Eritromicina	Resistente	Resistente	-----
Gentamicina	25.00 (+/- 0.70)	23.33 (+/- 0.51)	>0.05
Pefloxacina	26.80 (+/- 3.96)	Sensible	-----
Sulfametoxazol-Trimetoprim	Sensible	Sensible	-----
Tetraciclina	Resistente	Resistente	----

\* Cuando  $P > 0.05$ ,  $t_{calc.} < t_{tabla}$ , por tanto no hay diferencia significativa. Cuando  $P < 0.05$ ,  $t_{calc.} > t_{tabla}$ , y por tanto existe diferencia significativa.

En la tablas 7.3 y 7.4 se observan los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 utilizando unidiscos.

**Tabla 7.3. Resultados de los halos de inhibición -Analistas 1 y 2- (Unidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Ampicilina	20.0833	0.5149	2.5639
Cefalotina	19.3333	1.5596	8.0534
Cefotaxima	27.0000	1.3483	4.9940
Ceftazidina	Resistente	N.C.	N.C.
Cefuroxima	26.2500	1.5447	5.8848
Dicloxacilina	Resistente	N.C.	N.C.
Eritromicina	Resistente	N.C.	N.C.
Gentamicina	24.1666	1.5275	6.3207
Pefloxacina	24.8333	1.3371	5.3843
Sulfametoxazol-Trimetoprim.	31.0000	1.4770	4.7648
Tetraciclina	Resistente	N.C.	N.C.

**Tabla 7.4. Correlación existente entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 (unidiscos).**

Antibiótico.	Analista 1 X (+/- D.E.)	Analista 2 X (+/- D.E.)	Significancia. P
Ampicilina	20.33 (+/- 0.51)	19.83 (+/- 0.40)	>0.05
Cefalotina	20.50 (+/- 0.83)	18.16 (+/- 1.16)	>0.05
Cefotaxima	27.00 (+/- 0.63)	27.00 (+/- 1.89)	>0.05
Ceftazidina	Resistente	Resistente	-----
Cefuroxima	25.00 (+/- 0.63)	27.50 (+/- 1.05)	< 0.05
Dicloxacilina	Resistente	Resistente	-----
Eritromicina	Resistente	Resistente	-----
Gentamicina	23.16 (+/- 0.75)	25.16 (+/- 1.47)	< 0.05
Pefloxacina	24.50 (+/- 1.51)	25.16 (+/- 1.17)	>0.05
Sulfametoxazol-Trimetoprim	32.00 (+/- 0.63)	30.00 (+/- 1.41)	>0.05
Tetraciclina	Resistente	Resistente	-----

2) Sensidiscos gramnegativos.

Fabricante: Sanofi Diagnostics Pasteur.

Lote: MN-04-97

Cepa de referencia: *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Fecha de caducidad: 5 de Marzo de 1998

2.1. Determinación de la repetibilidad.

2.11 Utilizando *E. coli* ATCC 25922

En la tabla 8 y se observan los resultados obtenidos para los halos de inhibición, utilizando unidiscos.

**Tabla 8.0. Resultados de los halos de inhibición  
(Unidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Amikacina	24.5000	0.5773	2.3565
Ampicilina	16.2500	0.5000	3.0769
Carbenicilina	22.2500	0.5000	2.2471
Cefalotina	15.7500	0.5000	3.1746
Cefotaxima	29.0000	0.8164	2.8155
Ceftriaxona	30.2500	0.5000	1.6528
Gentamicina	22.7500	0.5000	2.1978
Netilmicina	26.7500	0.5000	1.8691
Nitrofurantoina	22.5000	0.5773	2.5660
Pefloxacina	26.7500	0.9574	3.5791
Sulfametoxazol- trimetoprim	30.7500	0.5000	1.6260

Nota. En el caso de los multidiscos, no es posible determinar los parámetros estadísticos, ya que los halos no pudieron ser leídos y no existen valores reales para estos.

El cloranfenicol no se utilizó durante el estudio debido a que es un antibiótico tóxico; y por lo tanto, se encuentra en desuso.

## 2.2 Determinación de la reproducibilidad.

### 2.2.1 Utilizando *E. coli* ATCC 25922

En este caso tampoco fue posible desarrollar un análisis estadístico al utilizar multidiscos en los antibiogramas, debido a la unión entre halos al momento de realizar la lectura, lo cual impidió el poder obtener una lectura de los dichos halos.

En la tablas 8.1 y 8.2 se observan los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 utilizando unidiscos.

**Tabla 8.1. Resultados de los halos de inhibición -Analistas 1 y 2- (Unidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Amikacina	24.0000	1.4142	5.8925
Ampicilina	17.8750	0.9910	5.5442
Carbenicilina	24.3750	0.7440	3.0524
Cefalotina	17.1250	0.6408	3.7423
Cefotaxima	32.1250	2.4164	7.5220
Ceftriaxona	32.2500	1.2817	3.9743
Gentamicina	22.7500	1.0350	4.5498
Netilmicina	26.0000	1.0690	4.1117
Nitrofurantoína	22.2500	1.0350	4.6521
Pefloxacina	29.5000	1.1952	4.0516
Sulfametoxazol-trimetoprim	30.0000	0.9258	3.0860

**Tabla 8.2. Correlación existente entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 (unidiscos).**

Antibiótico	Analista 1 X (+/- D.E.)	Analista 2 X (+/- D.E.)	Significancia P
Amikacina	25.00 (+/- 0.00)	23.00 (+/- 1.41)	>0.05
Ampicilina	17.50 (+/- 0.57)	18.25 (+/- 1.25)	>0.05
Carbenicilina	24.50 (+/- 0.57)	24.25 (+/- 0.95)	>0.05
Cefalotina	17.00 (+/- 0.81)	17.25 (+/- 0.50)	< 0.05
Cefotaxima	30.00 (+/- 0.81)	34.25 (+/- 0.95)	< 0.05
Ceftriaxona	31.25 (+/- 0.50)	33.25 (+/- 0.95)	< 0.05
Gentamicina	22.75 (+/- 0.50)	22.75 (+/- 1.50)	>0.05
Netilmicina	26.25 (+/- 0.50)	25.75 (+/- 1.50)	>0.05
Nitrofurantoína	22.50 (+/- 0.57)	22.00 (+/- 1.41)	>0.05
Pefloxacina	28.50 (+/- 0.57)	30.50 (+/- 0.57)	< 0.05
Sulfametoxazol-trimetoprim	29.50 (+/- 0.57)	30.5 (+/- 1.00)	< 0.05

2.1. Determinación de la repetibilidad.

2.11 Utilizando *P. aeruginosa* ATCC 27853.

En las tablas 9 y 9.1 se observan los resultados obtenidos para los halos de inhibición, utilizando multidiscos y unidiscos respectivamente.

**Tabla 9.0. Resultados de los halos de inhibición (multidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Amikacina	22.0000	0.8164	3.7113
Ampicilina	Resistente	N.C.	N.C.
Carbenicilina	16.5000	1.2909	7.8242
Cefalotina	Resistente	N.C.	N.C.
Cefotaxima	17.5000	1.0000	5.7142
Ceftriaxona	19.7500	0.9574	4.8477
Gentamicina	18.5000	1.2909	6.9783
Netilmicina	21.2500	1.2583	5.9214
Nitrofurantoina	Resistente	N.C.	N.C.
Pefloxacina	Resistente	N.C.	N.C.
Sulfametoxazol-Trimetoprim	Resistente	N.C.	N.C.

**Tabla 9.1. Resultados de los halos de inhibición (Unidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Amikacina	24.2500	0.5000	2.0618
Ampicilina	Resistente	N.C.	N.C.
Carbenicilina	16.7500	0.5000	2.9850
Cefalotina	Resistente	N.C.	N.C.
Cefotaxima	19.7500	0.5000	2.5316
Ceftriaxona	21.5000	0.5773	2.6853
Gentamicina	18.2500	0.5000	2.7397
Netilmicina	20.5000	0.5773	2.8163
Nitrofurantoina	Resistente	N.C.	N.C.
Pefloxacina	Resistente	N.C.	N.C.
Sulfametoxazol-Trimetoprim	Resistente	N.C.	N.C.

*Nota:* El cloranfenicol no se utilizó durante el estudio debido a que es un antibiótico tóxico; y por lo tanto, se encuentra en desuso.

En este caso, la cepa es resistente a algunos de los antibióticos de los sensidiscos, por lo tanto, no es posible determinar los parámetros estadísticos, ya que no existen valores reales para estos.

## 2.2 Determinación de la reproducibilidad.

### 2.2.1 Utilizando *P. aeruginosa* ATCC 27853

En la tablas 9.2 y 9.3 se observan los resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 utilizando multidiscos.

**Tabla 9.2 Resultados de los halos de inhibición -Analistas 1 y 2- (Multidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Amikacina	25.0000	2.6186	10.4744
Ampicilina	Resistente	N.C.	N.C.
Carbencilina	20.0000	2.3904	11.9522
Cefalotina	Resistente	N.C.	N.C.
Cefotaxima	19.6250	1.9955	10.1683
Ceftriaxona	22.6250	2.9246	12.9266
Gentamicina	21.1250	1.2464	5.9002
Netilmicina	20.0000	2.0000	10.0000
Nitrofurantoina	Resistente	N.C.	N.C.
Pefloxacina	Resistente	N.C.	N.C.
Sulfametoxazol-trimetoprim	Resistente	N.C.	N.C.

**Tabla 9.3. Correlación existente entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 (multidiscos).**

Antibiótico	Analista 1 X (+/- D.E.)	Analista 2 X (+/- D.E.)	Significancia P
Amikacina	23.25 (+/- 1.70)	26.75 (+/- 2.21)	< 0.05
Ampicilina	Resistente	Resistente	-----
Carbencilina	18.50 (+/- 1.29)	18.00 (+/- 1.15)	>0.05
Cefalotina	Resistente	Resistente	-----
Cefotaxima	19.00 (+/- 2.00)	20.25 (+/- 2.06)	>0.05
Ceftriaxona	20.25 (+/- 1.70)	25.00 (+/- 1.41)	< 0.05
Gentamicina	21.00 (+/- 1.41)	21.25 (+/- 1.25)	>0.05
Netilmicina	21.00 (+/- 1.41)	19.00 (+/- 2.16)	>0.05
Nitrofurantoina	Resistente	Resistente	-----
Pefloxacina	Resistente	Resistente	-----
Sulfametoxazol-trimetoprim	Resistente	Resistente	-----

**Tabla 9.4. Resultados de los halos de inhibición -Analistas 1 y 2- (Unidiscos).**

Antibiótico/Cálculo.	X	D.E.	C.V.(%)
Amikacina	23.6250	0.9161	3.8777
Ampicilina	Resistente	N.C.	N.C.
Carbenicilina	17.7500	0.8864	4.9938
Cefalotina	Resistente	N.C.	N.C.
Cefotaxima	19.0000	0.7559	3.9785
Ceftriaxona	21.5000	1.1952	5.5592
Gentamicina	20.3750	1.7677	8.6761
Netilmicina	20.6250	0.7440	3.6073
Nitrofurantoína	Resistente	N.C.	N.C.
Pefloxacina	Resistente	N.C.	N.C.
Sulfametoxazol-trimetoprim	Resistente	N.C.	N.C.

**Tabla 9.5. Correlación existente entre resultados obtenidos por el analista 1 y el analista 2 (unidiscos).**

Antibiótico	Analista 1	Analista 2	Significancia
	X (+/- D.E.)	X (+/- D.E.)	P
Amikacina	24.00 (+/- 0.81)	23.25 (+/- 0.95)	>0.05
Ampicilina	Resistente	Resistente	-----
Carbenicilina	18.00 (+/- 1.15)	17.50 (+/- 0.57)	>0.05
Cefalotina	Resistente	Resistente	-----
Cefotaxima	18.75 (+/- 0.50)	19.25 (+/- 0.95)	>0.05
Ceftriaxona	22.25 (+/- 0.95)	20.75 (+/- 0.95)	>0.05
Gentamicina	19.00 (+/- 0.81)	21.75 (+/- 1.25)	< 0.05
Netilmicina	21.00 (+/- 0.81)	20.25 (+/- 0.50)	>0.05
Nitrofurantoína	Resistente	Resistente	-----
Pefloxacina	Resistente	Resistente	-----
Sulfametoxazol-trimetoprim	Resistente	Resistente	-----

## DISCUSIÓN

Después de realizar una amplia investigación bibliográfica, y a pesar de tratarse de procedimientos de rutina en un laboratorio de microbiología, no se encontraron artículos que reportarán estudios semejantes al desarrollado en este trabajo, por lo cual no existen resultados previos con los que se puedan comparar los obtenidos durante el trabajo experimental, razón por la cual la discusión se enfoca únicamente a los resultados obtenidos durante las diferentes etapas de la implantación del programa de Control de Calidad y Validación en el laboratorio.

### 1.- Control de Calidad de Rutina.

a) Condiciones ambientales: Abarcó la determinación, tanto de la temperatura ambiental, como de la humedad relativa.

- Temperatura Ambiental: Los gráficos de control 1 y 1.1, correspondientes al registro de temperatura ambiental durante el período comprendido de Noviembre de 1996 a Septiembre de 1997, no muestran una variación considerable ni al inicio, ni al final de la jornada, éstos permanecen dentro de los límites de temperatura (22 a 30 °C) reportados en la bibliografía<sup>17</sup>. Dichos resultados sólo muestran variaciones cuando la temperatura ambiental es extrema, es decir cuando es muy baja, como sucede durante los meses de Diciembre y Enero, o bien muy alta como sucedería durante los meses de Abril y Mayo, sin embargo, a pesar de dichas variaciones, las desviaciones presentadas no fueron muy significativas, cabe mencionar que el registro de las temperaturas iniciales se llevó a cabo con los mecheros apagados, para así registrar la temperatura real del cuarto, así mismo, al final de la jornada, se esperó un período mínimo de 15 minutos después de apagar los mecheros, antes de registrar la temperatura, a fin de evitar posibles alteraciones en los mismos.

b) Equipo.

i) Estufa: El registro de temperatura de la estufa (gráficos 2 y 2.1) muestra una gran variación de resultados, con una tendencia a rebasar el límite superior de 37°C; esto puede deberse a un mal funcionamiento del regulador de temperatura, por lo cual es preciso localizar el punto adecuado donde mantenga la temperatura dentro del límite establecido (35-37°C), y evitar al máximo moverlo una vez encontrado este punto, además resulta importante que sea verificada por un técnico a fin de evitar estas variaciones.

Es importante también, la limpieza de la estufa, a fin de evitar contaminación de muestras que se dejen en incubación, la limpieza debe realizarse mensualmente, para evitar que la estufa se convierta en una fuente potencial de contaminación de muestras.

ii) Refrigerador 1 y congelador: En ambos casos, la temperatura muestra, durante los primeros meses de registro, una gran variabilidad, la cual poco a poco se va estabilizando hacia los últimos meses, esto se logró ajustando correctamente el regulador de temperatura, evitando al máximo que se altere su posición y con esto, cambiara la temperatura tanto del refrigerador como del congelador. Las temperaturas se revisaban antes de iniciar la jornada, y 15 minutos después de terminar la misma, a fin de permitir que esta se estabilizará y así registrar la temperatura real del equipo, ya que durante el período de trabajo, al abrir y cerrar constantemente la puerta del refrigerador, las temperaturas varían considerablemente, alterando los valores reales de la temperatura registrada.

iii) Refrigerador 2: En este caso, al tratarse de un refrigerador nuevo, la temperatura no muestra una gran variabilidad, manteniéndose dentro del rango indicado (2 a 8°C) en la bibliografía<sup>17</sup>, por lo cual se considera que se encuentra en condiciones óptimas para el trabajo de laboratorio.

iv) Microscopio y olla de presión: Se recomienda realizar una revisión general por personal especializado, cada 6 meses en el caso del microscopio, y en el caso de la olla de presión, revisar cada 15 días la relación tiempo-presión-temperatura para garantizar así un buen proceso de esterilización. Para esto, se recomienda utilizar esporas de *B. stearothermophilus*, o bien utilizar trozos de cinta testigo cada vez que se realice la esterilización para comprobar que esta se ha llevado a cabo correctamente. El revisar que estos equipos funcionen correctamente garantizará resultados confiables, y en especial, en el caso del autoclave, se asegurará que no haya peligro de contaminación biológica en el laboratorio al realizarse una esterilización inadecuada. A este respecto, cabe mencionar que las condiciones de esterilización manejadas dentro del laboratorio, son las adecuadas, ya que las esporas de *B. stearothermophilus* no lograron desarrollarse después de haber sido sometidas al ciclo de esterilización, lo cual indica un funcionamiento adecuado de la olla de presión.

v) Limpieza y desinfección: Al realizar correctamente la limpieza y desinfección del área, así como una esterilización adecuada del material biológico antes de desecharlo se garantizó que no hubiera riesgo de contaminar, tanto al personal de laboratorio, como a las muestras en estudio, lo cual indica que los resultados obtenidos a partir de estas últimas sean confiables y reproducibles, ya que durante el periodo que se trabajó implementando el programa de control, no se observó presencia de contaminación, ya fuera durante la preparación de medios de cultivo, o durante el procesamiento de las muestras, es por esto que es importante realizar estos procedimientos diariamente, antes y después de iniciar la jornada de trabajo.

## 2. Etapas de Control de Calidad.

### a) Control Preanalítico.

Al registrarse correctamente a los pacientes, darles las indicaciones adecuadas y realizar con toda precaución la toma de muestra, se evita confundir los estudios que se van a realizar, ya que se tienen perfectamente identificadas las muestras y al mismo tiempo, se evita que las muestras se contaminen al momento de tomarlas, siguiendo todas las precauciones necesarias, incrementando con esto la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados, reduciendo el margen de error en esta etapa del análisis clínico, la cual es muy importante, ya que de ésta depende que los pasos llevados a cabo en la siguiente etapa rindan resultados de calidad, realizando estudios correctos y teniendo bien identificadas las muestras.

### b) Control Analítico.

En esta etapa del control de calidad, hay que recordar que el mantener la precisión y exactitud de los diversos procedimientos es lo más importante para el laboratorio clínico, de acuerdo con Sunderman W., el cuál remarca esta importancia diciendo que el mantener estándares de calidad no sólo sirve como un estímulo científico para el laboratorio, sino también como un beneficio directo para los pacientes, lo cuales, de acuerdo a Moss, F. y cols., son el principio fundamental del Control de Calidad, ya que la calidad debe definirse en términos de las necesidades de los pacientes.

- Determinación de sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento microbiano en el agua destilada o desmineralizada.

Este tipo de análisis, sirve para garantizar que el agua con la que se prepararán los medios de cultivo y reactivos en general del área de microbiología, no promoverá ni inhibirá el desarrollo microbiano, alterando los resultados que se pudieran obtener en el laboratorio; este análisis se realizó cada vez que se recibía un lote nuevo de agua destilada, en este caso, se llevó a cabo tres veces, dos de las cuales el lote fue rechazado por contener fuentes de nitrógeno y/o carbono que promueven el crecimiento de las bacterias, representando de esta manera una posible fuente de contaminación de reactivos y de medios de cultivo. En este caso se recomienda, hacerle saber al distribuidor del agua destilada que ésta es de mala calidad y no puede ser utilizada para el propósito al cual está destinada, y sugerirle el implantar un control de calidad de este tipo para así garantizar de antemano que el agua recibida es de buena calidad; o bien, cambiar de distribuidor hasta encontrar agua destilada que cumpla los requerimientos necesarios para el área de microbiología.

- Medios de Cultivo y pruebas bioquímicas.

En este caso, el llevar a cabo un correcto registro de cada lote de preparación de los diferentes medios de cultivo y pruebas bioquímicas, garantizó el llevar un control adecuado de las fechas y cantidades de preparación, el volumen y el nombre de la persona que se encargó de preparar cada lote. Esto, con el fin de poder detectar cualquier anomalía que pudiera presentarse durante el proceso (preparación errónea de los medios, contaminación de los mismos, pérdida de reactivos, etc.) y poder tomar las medidas correctivas necesarias que el caso amerite. Además, el realizar el inventario de los medios de cultivo en existencia es útil, porque así se sabe de manera rápida y efectiva con que tipo de medios cuenta el laboratorio, así como aquellos que presentan una fecha de caducidad más próxima, para utilizarlos antes que aquellos que tardarán más en caducar. Por otra parte, la preparación de los medios de acuerdo a las indicaciones del fabricante, evita modificaciones que puedan alterar los resultados obtenidos.

En cuanto a los resultados de los diferentes controles realizados, solo un lote de agar sangre fue rechazado debido a que la sangre con la cual se preparó, estaba contaminada; todos los demás lotes fueron aceptados, ya que cumplían con las características propias de cada uno de ellos.

En lo referente al control de pH, éste se realizó utilizando papel indicador, razón por la cual los valores se expresaron en cifras cerradas, los resultados no mostraron variaciones significativas, por lo cual se procedió a realizar los demás controles. Los controles de esterilidad y funcionalidad no representaron ningún problema, ya que todos los lotes fueron aceptados, cumpliendo con las características requeridas para su uso; el control de caducidad no fue realizado, ya que al prepararse lotes muy pequeños, éstos se terminaban de utilizar antes de alcanzar su fecha de caducidad. Es importante recalcar la importancia de este grupo de controles de calidad, ya que con éstos se aseguran resultados confiables que no pongan en juego la salud del paciente.

- Antibióticos.

Se rechazaron aquellos lotes, en los que la mayor parte de los halos de inhibición (más de 7), no correspondieran con los valores reportados en la bibliografía<sup>17, 20, 21</sup>, mientras que, por otra parte, fueron aceptados aquellos lotes en los que la mayor parte de los halos de inhibición (más de 7), correspondieran con los valores reportados en la bibliografía. Cabe mencionar que para realizar este estudio, se utilizaron únicamente placas de agar de Mueller-Hinton, ya que es el único medio del laboratorio que, debido a sus propiedades osmóticas, permite la difusión homogénea de los diferentes antibióticos, sin afectar su mecanismo de acción, ya sea bacteriostático o bactericida.

Cabe mencionar que los lotes rechazados eran lotes cuya fecha de caducidad ya había sido rebasada y que aún se encontraban entre los lotes para uso cotidiano dentro del laboratorio, razón por la cual se les realizó el control para poder proceder a su eliminación. El que la fecha de caducidad haya sido rebasada es un factor importante, ya que los antibióticos podían haber perdido ya sus propiedades inhibitorias, esto aunado a la variabilidad biológica de las cepas utilizadas, la cual les confiere una mayor o menor resistencia a ciertos antibióticos, causó una gran variación en los resultados obtenidos, ocasionando que éstos fueran diferentes de los reportados en la bibliografía. En cuanto a los lotes que fueron aceptados, las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* se comportaron como se esperaba de acuerdo a la sensibilidad reportada en la bibliografía, mientras que la cepa de *S. aureus* fue la única que mostró alteraciones en los resultados, mostrando resistencia a Cefazidima, Eritromicina y Tetraciclina, antibióticos a los cuales la cepa debía mostrar sensibilidad, esto puede deberse a la variabilidad biológica de los microorganismos, la cual pudo conferir resistencia a dichos antibióticos, ya que dichos lotes a los que fue resistente, no habían pasado su fecha límite de caducidad.

#### c) Control Postanalítico.

##### -Entrega de resultados.

Al entregar los resultados al paciente o al médico por escrito, con limpieza, claridad, y anotando las observaciones que se crean pertinentes, se asegura que no haya confusiones al momento de realizar la interpretación de dichos resultados, minimizando con esto los posibles errores que pudieran surgir al momento de emitir algún posible diagnóstico.

#### d) Documentación.

La creación de los manuales de procedimientos, de control, y de validación, así como de las bitácoras de trabajo, el inventario y las hojas de registro, garantiza que todo el personal de laboratorio conozca las diferentes técnicas a seguir, los controles, los reactivos con los que cuenta el laboratorio, además de que podrá mantener al día los registros de resultados de cada uno de los diferentes controles, tanto de equipo como de reactivos, con esto se garantiza, el obtener resultados de calidad, es decir confiables y repetibles, minimizando al máximo las posibles fuentes de error que puedan interferir al momento de interpretar un resultado.

### 3. Validación de los antibiogramas.

Se consideró como aceptable un valor de coeficiente de variación (C.V.) de hasta 5% (Castañeda P.<sup>13</sup>), tanto para los sensidiscos grampositivos como gramnegativos, en las determinaciones de repetibilidad y reproducibilidad, en ambos casos, los resultados utilizando unidiscos fueron de mejor calidad que en los que se utilizaron multidiscos, ya que en este último caso no se podían leer los halos de inhibición ya que se unían unos con otros, y parecía como si el microorganismo fuera sensible a todos los antibióticos, este resultado era erróneo, ya que los halos se unen por la cercanía de los discos, lo cual se comprueba al utilizar los unidiscos, en los cuales se podían apreciar perfectamente los halos de inhibición; razón por la cual, el análisis estadístico del estudio utilizando multidiscos no pudo realizarse en algunos casos. Al obtener los resultados de los coeficientes de variación, la diferencia se vuelve a hacer patente al no existir una concordancia entre los resultados de multidiscos con unidiscos, en el primer caso, los valores fueron mayores, e incluso varios de ellos (el 73%) rebasaron por mucho el valor límite de 5%, llegando hasta 12.9 % en el caso de la *Pseudomonas aeruginosa* (tabla 9.2), esto puede deberse principalmente a la variabilidad obtenida en los halos de inhibición, producida por la cercanía de los sensidiscos, lo cual impidió que varios de los coeficientes de variación pudieran determinarse al no existir valores para ellos. Por otra parte, en el caso de los unidiscos, todos los halos pudieron leerse, y por consiguiente se determinaron todos los coeficientes de variación, obteniéndose resultados menores, en los cuales, la mayoría de ellos se encontró dentro del límite, en algunos casos, el coeficiente de variación se elevó a más de 5%, en algunos casos solamente por décimas (ver tablas 7.3, 8.1, y 9.4), siendo el valor más alto de 8.6% para *Pseudomonas aeruginosa*. Esto puede deberse a varios factores, como podría ser la variabilidad biológica de la cepas, el número de resiembras a la que dicha cepa haya sido sometida antes del estudio, el grosor del agar en la caja de petri, e incluso errores del analista al momento de leer y registrar los valores de los halos de inhibición. Sin embargo, a pesar de esto, la mayoría de los resultados (39 de 49 en total, esto es el 79.6%) registraron una variabilidad menor a 5%, con lo cual se puede observar, comparando con los resultados obtenidos con los multidiscos, que el usar los unidiscos para realizar los antibiogramas es mucho más confiable, y rinde resultados de mejor calidad que el utilizar multidiscos. En el caso del análisis utilizando unidiscos, la ceftazidina, por parte de los sensidiscos para microorganismos grampositivos, presentó un C.V. de 49.6%, esto puede deberse principalmente a la variabilidad biológica de la cepa de *S. aureus*, la cual presentó también resistencia a la eritromicina y a la tetraciclina, siendo la única cepa que presentó este comportamiento de multiresistencia, el cual de acuerdo a Duckworth y cols., es incluso, un factor de variabilidad más importante que la multiresistencia presente en *P. aeruginosa*, el cual es también uno de los más peligrosos, ya que en el caso del *S. aureus*, este puede expandirse por vía aérea, pudiendo provocar una epidemia con una cepa multiresistente.

Finalmente, al realizar el estudio para determinar la concordancia de resultados entre el analista 1 y el analista 2 por medio de una *t de student*, se encontró que la diferencia entre ambos no fue significativa (es decir se obtuvo una  $p > 0.05$ ) en la mayoría de los casos, tanto para sensidiscos grampositivos y gramnegativos, utilizando multidiscos y unidiscos, en total, solamente 10 de los resultados (30% del total), mostraron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), lo cual puede deberse principalmente a errores de lectura al momento de registrar los halos de inhibición, pero en general puede decirse que existe una concordancia aceptable entre los resultados obtenidos. Cabe mencionar que no pudo determinarse la concordancia para todos las determinaciones en la que se utilizaron multidiscos, debido a la unión entre los halos de inhibición, lo cual impidió obtener lecturas de los mismos.

## CONCLUSIONES

1. Se estableció un Programa Integral de Control de Calidad en el área de microbiología clínica, seleccionando, y adaptando los procedimientos preestablecidos en la bibliografía consultada más adecuados, de acuerdo a las necesidades y carencias del laboratorio.

2. La temperatura del área se mantiene dentro de los límites marcados por la bibliografía, por lo tanto es la adecuada para realizar el trabajo, sin embargo, la humedad relativa no fue determinada por falta de equipo, por lo cual se recomienda tratar de conseguir un higrómetro para poder realizar su determinación y control.

3. Las condiciones de trabajo del equipo (incubadora y refrigeradores) son las adecuadas para realizar las determinaciones en el laboratorio, se recomienda se realice un chequeo general de los mismos periódicamente por personal especializado.

4. El agua analizada, mostró presencia de fuentes de carbono y nitrógeno que promueven el desarrollo microbiano, por esto, no se considera ideal trabajar con ella, se recomienda, por lo tanto, cambiar de distribuidor.

5. Tanto medios de cultivo, como pruebas bioquímicas, aprobaron todos los controles realizados, por lo cual cumplen con las características requeridas por el laboratorio de microbiología. Se recomienda realizar la determinación del ICA en forma rutinaria, adaptando la técnica a las limitaciones del laboratorio, ya que no se cuenta con la micropipeta de 1  $\mu$ L requerida para la determinación.

6. Las pruebas de control microbiológico rindieron resultados satisfactorios, a pesar de haberse realizado con la técnica de los multidiscos (que era la técnica que se estaba siguiendo de manera rutinaria dentro del laboratorio), sin embargo, dicha técnica mostró ciertas deficiencias al compararse con la técnica de los unidiscos, por lo cual fue desechada como técnica de rutina.

7. La validación de las pruebas de sensibilidad mostraron mejores resultados con la técnica de unidiscos, que con la de los multidiscos, mostrando coeficientes de variación menores y resultados más significativos, por lo cual se optó por adoptar esta técnica como trabajo de rutina dentro del laboratorio, ya que a pesar de existir técnicas más sofisticadas como sería la técnica de dilución, el laboratorio no cuenta con los recursos necesarios para adoptar dichas técnicas, y el procedimiento utilizando unidiscos responde y cumple a las necesidades del laboratorio, considerándose adecuado para el trabajo que en él se desarrolla.

## APÉNDICE I.

### Registro y Control de Cepas de Referencia ATCC.

#### Cepas Disponibles:

##### Cepa:

Enterobacter cloacae

Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Proteus vulgaris

Pseudomona aeruginosa

Salmonella typhimurium

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus pyogenes

Serratia marcescens

Bacillus subtilis

Bacillus stearothermophilus

Candida albicans

##### Clave:

ATCC 23355

ATCC 25922

ATCC 13883

ATCC 13315

ATCC 27853

ATCC 14028

ATCC 25923

ATCC 19615

ATCC 19615

ATCC 8100

Medio de cultivo utilizado: Agar soya tripticaseína.

Conservación de los cultivos: Se inocula el medio por picadura y se incuba a 35°C durante 18-24 horas; después se sella el tapón con parafina y se guarda el tubo en cajas cerradas a temperatura ambiente. Permite la vialidad de muchos gérmenes (Enterobacterias, Staphylococcus sp, etc.) por espacio de varios meses. Si el germen se utiliza mensualmente, el medio se prepara inclinado y se siembra en estría, conservándolo a temperatura ambiente.

Tiempo de conservación de los microorganismos: 1 mes, después del cual se debe resembrar el microorganismo en medio fresco.

## APÉNDICE II.

### Preparación de medios de cultivo.

#### - Infusión cerebro y corazón (BIOXON).

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Infusión de cerebro de ternera.....	200.0
Infusión de corazón de res.....	250.0
Peptona de gelatina.....	10.0
Dextrosa.....	2.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Fosfato disódico.....	2.5

pH final 7.4 +/- 0.2

Preparación:

Suspender 37g del medio deshidratado en un litro de agua destilada y calentar ligeramente, si es necesario. Envasar y esterilizar a 121°C (15 lbs. de presión) durante 15 minutos.

#### - Agar Soya-Trypticaseína

##### a) Caldo Soya-Trypticaseína (BIOXON)

Fórmula aproximada en gramos por litro:

Peptona de caseína.....	17.0
Peptona de soya.....	3.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Fosfato dipotásico.....	2.5
Dextrosa.....	2.5

pH final 7.3 +/- 0.2

##### b) Agar bacteriológico (BIOXON).

Preparación:

Suspender 30 gramos del medio soya-trypticaseína en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Agregar 15 gramos de agar bacteriológico deshidratado. Mezclar y calentar ligeramente hasta lograr la solución. Esterilizar a 121°C (15 lbs. de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar entre 45° a 50° y distribuya en cajas de Petri.

## BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Pumarola A, Rodríguez A. Microbiología y parasitología médica. 2a.ed. Barcelona: Salvat Editores, 1987:25-30, 120-133, 343-352, 413-421.
- 2.- Brock T, Madigan M. Microbiología. 6a.ed. México: Prentice Hall, 1993: 16-21, 503-529.
- 3.- Davis D. Tratado de microbiología. 3a.ed. Barcelona: Salvat Editores, 1985: 94-106.
- 4.- Romero R. Microbiología y parasitología humana. México: Edit. Médica Panamericana, 1993: 22-54.
- 5.- Sherris J, Champoux J, Corey L. Microbiología médica. Barcelona:Edit. Doyma, 1993: 18-24, 225-280.
- 6.- Katzung B. farmacología básica y clínica. 6a.ed. México: edit. Manual Moderno, 1996: 817-940.
- 7.- Gitlow S. Planificando para la calidad, la productividad y una posición competitiva. México: Ventura Ediciones, 1991: 3-17.
- 8.- Feigenbaum A. Control total de la calidad. 3a.ed. México: Compañía Editorial Continental S.A. de C.V., 1995: 3-70.
- 9.- Perea E. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Barcelona: Edit. Doyma, 1992: 255-261.
- 10.- Castillo M, Fonseca M. Mejoría continua de la calidad, guía para los laboratorios clínicos de América Latina. México: Edit. Médica Panamericana, 1995: 9-15, 75-84.
- 11.- Hawkey P, Lewis D. Medical bacteriology, a practical approach. Oxford: IRL Press, 1989: 235-246.
- 12.- Whitehead T, Woodford F. External quality assessment of clinical laboratories in the United Kingdom. J.Clin.Pathol. 1981; 34: 947-957.
- 13.- Castañeda P, Giral C. métodos analíticos: Validación. México:S.S.A., 1991: 1-35

- 14.- Brock D, Madigan T. *Biology of microorganisms. 5th.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1988: 474-496.*
- 15.- Bernard J. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9a.ed. México: Masson-Salvat Medicina, 1994: 1327-1340.
- 16.- Lennette E. Manual de microbiología clínica. 4a.ed. Buenos Aires: Edit. Médica Panamericana, 1987: 37-45.
- 17.- Niño H, Barrera L. Garantía de calidad en el laboratorio clínico. Colombia: Edit. Panamericana, 1987: 37-45.
- 18.- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, México: Diario Oficial, 24 de noviembre de 1995: 15-81.
- 19.- Castañeda P, Giral C. *Medios de cultivo: Validación. México:SSA, 1990: 1-48.*
- 20.- Diccionario de Especialidades en Análisis Clínicos. 7a.ed. México: PLM, 1993: 160-181.
- 21.- Finegold S, Baron E. *Bailey-Scott. Diagnóstico microbiológico. 7a.ed. Buenos Aires: Edit. Médica Panamericana, 1989: 29-68.*
- 22.- González J. Tecnología y métodos del laboratorio clínico. México: Salvat Editores S.A., 1992: 137-147.
- 23.- Cowan S. Manual para la identificación de Bacterias de importancia médica. 2a.ed. México: Edit. Continental, 1979: 33-36.
- 24.- Mac Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México: Editorial médica panamericana, 1991: 39-60, 104-120, 134-148, 183-198.
- 25.- Ellis R. Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de microbiología. Atlanta: *Center for Disease Control. 1980: 2-97.*
- 26.- Tortora G, Funke B, Case C. *Microbiology. 5th.ed. New Jersey: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1995: 142-166.*
- 27.- Power D, Mc Cuen P. *Manual of Baltimore biological laboratory products and laboratory procedures. 6th.ed. Maryland: Baltimore Biological Laboratory, 1988: 67-97.*

- 28.- *Stebbing L.* Aseguramiento de la calidad. México: CECSA, 1994: 19-50.
- 29.- *Goodman G.* Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8a.ed. México: Edit. Panamericana, 1991: 1128-1136.
- 30.- *Prats G.* Microbiología médica. Barcelona: Edit. Doyma, 1993: 21-28.
- 31.- *Duerden B, Jewsbury J, Turk D.* Microbiología de enfermedades infecciosas. México: Edit. Limusa, 1993: 470-490.
- 32.- *Barry A, Allen S, Fuchs P.* Quality control parameters for broth microdilution susceptibility testing of amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 1994; 13:186-188
- 33.- *Sunderman F.* The history of proficiency testing/quality control. *Clin.Chem.* 1992; 38: 1205-1209.
- 34.- *Westgard J.* Simulation and modeling for optimizing quality control and improving analytical quality assurance. *Clin.Chem.* 1992; 38: 175-178.
- 35.- *Catañeda K.* Proficiency testing from a total quality management perspective. *Clin.Chem.* 1992; 38: 615-618.
- 36.- *Duckworth G, Nair P, Henderson J.* Methicillin resistant staphylococcal infection. *BMJ.* 1994; 308: 57-59.
- 37.- *Moss F, Garside P.* The importance of quality: sharing responsibility for improving patient care. *BMJ.* 1995; 310: 996-999.
- 38.- *Barry A, Pfaller M, Jorgensen J.* Revision of quality control limits for broth microdilution tests of fleroxacin and gentamicin with *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 1994; 13: 1087-1089.
- 39.- *Méndez Y, Namihira D, Moreno L.* El protocolo de investigación. 2a.Ed. México: Edit. Trillas, 1990: 11-84.
- 40.- *Marques M.* Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. México: *Mc Graw-Hill*, 1991: 184-199.
- 41.- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, México: Diario Oficial, 7 de noviembre de 1995: 2-11.