

## **I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN**

Esta investigación se realizará dentro del área de Microbiología, del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, implementando controles internos, conformando así un sistema de calidad, el cual será de beneficio para la acreditación del laboratorio.

## II. RESUMEN

El control de calidad interno consiste, en los procedimientos de control realizados por un laboratorio, para la evaluación continua de su trabajo. La documentación juega un papel importante en el desarrollo de todos los procesos que se llevan a cabo dentro de un laboratorio, pues además de cumplir funciones específicas en cada área, orientan al personal del establecimiento en todas las actividades que se deben realizar. Es por esta razón, que el propósito de este trabajo fue implementar y verificar el programa de control interno de calidad para el área de Microbiología del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, teniendo en cuenta los requerimientos establecidos en la norma NTC-ISO-IEC 17025. Este proyecto se inicio con la revisión de los documentos existentes, seguido de la redacción e implementación de nuevos controles entre los que están: monitoreo de ambientes internos y externos del laboratorio, control de ambiente y superficie de la campana de flujo laminar, comprobación del proceso de esterilización del autoclave con cepas de *Geobacillus stearothermophilus*, control interno del personal técnico a cargo de los análisis del laboratorio, la creación de un manual de manejo de equipos que incluye información general, principios de operación, recomendaciones de mantenimiento preventivo y correctivo, limpieza de los mismos, y por último la creación del cepario con 20 cepas ATCC, utilizando dos métodos de conservación, a saber: aceite mineral y congelación con glicerol, con su respectivo manual, el cual incluye características generales, pruebas bioquímicas y los respectivos medios de cultivo para cada microorganismo, realizando controles positivo y negativo para los medios de cultivo y las pruebas de identificación utilizadas en el laboratorio.

En el monitoreo de ambientes interno y externo se obtuvieron conteos elevados tanto bacterianos como fúngicos. Para el ambiente interno del laboratorio, se implementó la aplicación de dos químicos (amonio cuaternario y ácido peracético), utilizados para la desinfección de ambientes. Obteniendo resultados satisfactorios, ya que los recuentos de bacterias y mohos y levaduras disminuyeron.

Para el ambiente y la superficie de la campana de flujo laminar, se estandarizó el tiempo para la correcta limpieza y desinfección de la misma, Para el ambiente se obtuvo un 100% de efectividad, lo cual se pudo comprobar a través de los monitoreos de bacterias y mohos y levaduras. Con relación a las superficies se obtuvo un 89.5% de efectividad, siendo necesario implementar acciones correctivas para lograr un área estéril que pueda ser utilizada para el procesamiento de las muestras y este no se convierta en foco de contaminación cruzada.

Se comprobó el proceso de esterilización del autoclave con cepas Attest de *Geobacillus stearothermophilus* obteniendo un 93% de resultados satisfactorios. Se evaluó al personal técnico del laboratorio obteniendo un 87.5% de efectividad en resultados reportados.

Es necesario que se le de seguimiento a la aplicación de controles internos para tener un grado aceptable de seguridad y de conformidad de acuerdo con la normativa de regulación NTC-ISO-IEC 17025.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **A. Introducción**

El crecimiento en el uso de sistemas de la calidad generalmente ha aumentado la necesidad de asegurar que los laboratorios, que forman parte de organizaciones más grandes o que ofrecen otros servicios, puedan operar un sistema de la calidad que esté conforme con la Norma COGUANOR NGR/ISO 17025. Hoy en día, se requiere la optimización de los recursos, tanto humanos, como materiales, la mayor eficiencia y eficacia en los procesos, y esencialmente la satisfacción de los clientes, con costos razonables; que se puedan aplicar a los laboratorios (1).

Los hábitos de consumo de agua y alimentos han sufrido cambios importantes en muchos países en las últimas décadas, esto por parte del consumidor que cada vez exige más calidad, por lo que es imprescindible de parte de las empresas un control eficaz de la higiene y el cumplimiento de normas establecidas por parte de las autoridades. Debido a esto los laboratorios microbiológicos y de diagnóstico, juegan un papel esencial en el control de estos procesos, por lo que se debe contar con un sistema adecuado para realizar y documentar las técnicas utilizadas en la evaluación del agua y los alimentos.

Es imprescindible contar con laboratorios microbiológicos capaces de generar y producir datos con precisión y confiabilidad para lograr la correcta dimensión de las muestras problema a analizar. A fin de lograr este objetivo los laboratorios deben implementar y verificar, en forma rutinaria y continua, un programa ajustado de control de calidad interno que debe complementarse con un programa de calidad externo. La implementación del programa de calidad interno permite el desarrollo de la cultura de la calidad, especialmente cuando el sistema se desarrolla de forma participativa. Además, la sistematización de las tareas y el análisis de los resultados contribuyen a conseguir mejoras en los

servicios, aumentando la competitividad y en consecuencia generando resultados confiables (1).

La competitividad es aplicable tanto a empresas comerciales como a laboratorios. Actualmente se requiere de, la optimización de los recursos, tanto humanos, como materiales, mayor eficiencia y eficacia en los procesos, y esencialmente la satisfacción de los clientes, con costos razonables; teniendo en consideración que está en juego la salud y el bienestar de las personas y de la comunidad (1).

Los laboratorios que realizan análisis de: aguas, control de medio ambiente, salud pública, investigación, control de alimentos, medicamentos y clínico, generan productos y servicios, tanto al paciente y comunidad, como al personal clínico, a las instituciones y autoridades de salud y a las empresas. En esta situación, las exigencias de la salud y la seguridad, así como los requisitos legales y las leyes del mercado, obligan a los laboratorios a incorporar el concepto de calidad en sus rutinas diarias (1).

## **B. Sistema de control interno de calidad**

El propósito de un sistema de calidad es permitirle a las organizaciones conseguir, mantener y mejorar la calidad en sus productos y/o servicios; en este sistema se organizan los recursos para alcanzar ciertos objetivos, estableciendo reglas y una infraestructura, que si se mantiene, proporciona los resultados deseados. Los sistemas de calidad pueden dirigirse a una de las metas de calidad, es decir, mantener los estándares, más que mejorarlos. Los estándares ISO 9000:2000, están enfocados únicamente sobre la calidad del producto o servicio suministrable (2).

Las normas ISO 9000 son una serie de estándares internacionales para sistemas de calidad. Especifican las recomendaciones y requerimientos para el diseño y valoración de un sistema de gestión, con el propósito de asegurar que las organizaciones proporcionan productos y servicios que satisfagan los requerimientos especificados. Estos requerimientos pueden ser específicos del

cliente que las organizaciones se comprometen a proporcionar en ciertos productos y servicios o pueden ser requerimientos de un mercado concreto determinados por la organización (2).

Un enfoque para desarrollar e implementar un sistema de gestión de la calidad comprende diferentes etapas tales como:

1. Determinar las necesidades y expectativas de los clientes, y de quienes están interesados.
2. Establecer la política y objetivos de calidad de la organización.
3. Determinar los procesos y las responsabilidades necesarias para el logro de los objetivos de la calidad.
4. Determinar y proporcionar los recursos necesarios para el logro de los objetivos de calidad.
5. Establecer los métodos para medir la eficacia y eficiencia de cada proceso.
6. Aplicar estas medidas para determinar la eficacia y la eficiencia de cada proceso.
7. Determinar los medios para prevenir no conformidades y eliminar sus causas.
8. Establecer y aplicar un proceso para la mejora continua del sistema de gestión de calidad.

Una organización que adopte el enfoque anterior (enfoque basado en procesos) genera confianza en la capacidad de sus procesos, con el que se busca que la organización articule sus procedimientos y tareas de forma sistémica, evidenciado en la calidad de sus productos y proporcionando una base para la mejora continua de la organización (3).

### **C. Pirámide documental**

La pirámide documental describe una jerarquía característica de la documentación de un sistema de calidad. El orden de desarrollo de la jerarquía en determinada organización dependerá de sus circunstancias particulares (anexo 1, figura 1. Pirámide documental) (4).

1. Nivel 1, en el que se ubica el manual de calidad, el cual describe el sistema de calidad en concordancia con la política y objetivos de calidad.
2. Nivel 2, en el que se ubican los procedimientos del sistema de calidad, los cuales describen las actividades de la unidad funcional necesarias para implantar los elementos del sistema de calidad.
3. Nivel 3, en el cual se encuentran los documentos de calidad, conformados por documentos de trabajo detallado, como los instructivos (que describen en forma breve el modo de realizar una actividad) y los registros de calidad (que evidencian el desarrollo de las actividades) (4).

#### **D. Estructura documental del sistema de gestión de la calidad**

La documentación permite la comunicación del propósito y la coherencia de la acción o realización de actividades. Su utilización contribuye a:

- Lograr la conformidad con los requisitos del cliente y la mejora de la calidad.
- Proveer la información apropiada.
- Proporcionar evidencias objetivas, repetibilidad y trazabilidad.
- Evaluar la eficacia y la adecuación continua del sistema de gestión de calidad.

Cada organización determina la extensión de la documentación requerida y los medios a utilizar. Esto depende de factores tales como el tipo y el tamaño de la organización, la complejidad e interacción de los procesos, la complejidad de los productos, los requisitos de los clientes, los requisitos reglamentarios que sean aplicables, la competencia demostrada del personal y el grado en que sea necesario demostrar el cumplimiento de los requisitos del sistema de gestión de calidad (4). La elaboración de la documentación no debería ser un fin en sí mismo, si no una actividad que aporta valor, esta debe incluir:

##### **1. Política y objetivos de la calidad**

La política de la calidad y los objetivos de la calidad se establecen para proporcionar un punto de referencia para dirigir la organización. Ambos

determinan los resultados deseados y ayudan a la organización a aplicar sus recursos para alcanzar dichos resultados. La política de calidad es el resultado de un análisis de los planes del cliente, así como el valor agregado que es posible ofrecer a su cadena productiva, basándose en sus requisitos (5).

La política de calidad proporciona un marco de referencia para establecer y revisar los objetivos de la calidad; estos tienen que ser coherentes con la política de calidad y el compromiso de mejora continua, y su logro debe ser medible. El logro de los objetivos de la calidad puede tener un impacto positivo sobre la calidad del producto, la eficacia operativa y el desempeño financiero y en consecuencia sobre la satisfacción y la confianza de los clientes y la organización (3, 4).

## **2. Procedimientos documentados**

Son una secuencia de pasos para ejecutar una tarea de rutina. En ellos se describe como se desempeñan las diferentes actividades de una organización (2). En concordancia con la serie ISO 9000, estos procedimientos deben cubrir todos los elementos aplicables del sistema de calidad de la norma; deben describir, a un grado de detalle requerido para un control adecuado de las actividades concernientes, las responsabilidades, autoridades e interrelaciones del personal que administra, desempeña, verifica o revisa el trabajo que afecta la calidad, haciendo explícito como las diferentes actividades deben ser desempeñadas y la documentación debe ser utilizada (4).

## **3. Procedimientos operativos (POEs)**

Los procedimientos de operación establecen como se realizan tareas específicas. Estos hacen referencia a los estándares y guías que se necesitan para llevar a cabo las tareas, documentar los resultados y contener los formularios utilizados para registrar la información. El principal propósito de los procedimientos operativos es garantizar la consistencia, reproducibilidad e uniformidad en el desarrollo de los procesos y características finales del producto (2).

#### **4. Registros**

Los registros son aquellos documentos o datos que se pueden presentar a terceros para demostrar el cumplimiento de un requerimiento de calidad; proporcionan evidencia que indica que se realizan las actividades establecidas en los procedimientos documentados e instrucciones de trabajo. Las exigencias de la serie ISO 9000, se cumplen mediante los procedimientos, y los registros son el aval que confirma el cumplimiento de una exigencia (4, 5).

#### **5. Enfoque basado en procesos**

La serie de normas ISO 9000, se dirige primordialmente al alcance de resultados más eficientes, por medio de la gestión como un proceso de los recursos y las actividades (planteando las actividades como un proceso) (6). El propósito de este enfoque, es alinear las actividades de la organización en una sola dirección, de manera que todas estén orientadas a la satisfacción del cliente; asegura que las actividades se visualizan, iniciando con la identificación de las necesidades de los clientes hasta llegar a la realización de los resultados deseados a través de toda la organización (6,7).

Una metodología que facilita la gestión del enfoque basado en procesos, es el ciclo de calidad de Edward Deming. En el ciclo de calidad; planificación (P) incluye la determinación de objetivos y el desarrollo del enfoque de procesos, para luego realizar o hacer (H) el producto con los recursos necesarios, y llevar a cabo el despliegue a través de la medición de los diferentes factores del proceso (V) (verificar), registrando y analizando los datos, efectuando acciones correctivas y preventivas, realizando la revisión de la dirección y actuando (A) proponiendo mejoras a la política y los objetivos de calidad (anexo 2, figura 2. Mejora continua del sistema de gestión de calidad) (5).

Los requisitos establecidos por ISO 9000:2000, para la implementación de un sistema de gestión de calidad, son aplicables a todas las organizaciones sin importar el tipo de producto o servicio que preste; bajo el esquema de esta normativa, se puede lograr la certificación por una tercera parte que verifica y

valida las organizaciones. Sin embargo, para los laboratorios de ensayo y calibración, la certificación con esta norma no garantiza la competencia del laboratorio en el desarrollo de sus actividades, por lo que se hace muy importante una acreditación con la norma NTC-ISO-IEC 17025:2005, la cual permite verificar y reconocer la competencia de los laboratorios en las operaciones y técnicas realizadas, generando un mayor grado de confianza en la satisfacción de los clientes, así como en la entrega de resultados (6 ,7).

### **E. Norma NTC-ISO-IEC-17025:2005**

Esta norma ha sido elaborada, como resultado en la aplicación, para sustitución de la Guía ISO/IEC 25 y la Norma Europea EN 45001, en Guatemala es la COGUANOR NTG/ ISO/IEC 17025:2005 que sustituye a la NGR/COPANT/ISO/IEC 17025, la cual contiene todos los requisitos que los laboratorios de ensayo y calibración tienen que cumplir si desean demostrar:

- Que disponen de un sistema de gestión de la calidad.
- Que son técnicamente competentes.
- Su capacidad para producir resultados técnicamente válidos.

La norma NTC-ISO-IEC-17025:2005, ha sido escrita para incorporar todos los requerimientos de la norma ISO 9001 que son relevantes para los laboratorios de ensayo y calibración; especifica tanto los requerimientos técnicos como la competencia técnica de los laboratorios. Los laboratorios de ensayo y calibración que implementan la norma ISO-IEC-17025, operan de acuerdo con la norma ISO 9001, debido a que la norma ISO-IEC-17025, cumple con los requisitos técnicos de la serie ISO 9000 (8).

#### **1. Alcance y campo de aplicación**

La norma NTC-ISO-IEC-17025:2005 establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio.

La aplicación de esta norma incide primordialmente en los laboratorios, para el desarrollo de los sistemas de gestión en sus actividades de calidad, actividades técnicas y actividades administrativas. El campo de aplicación también abarca a los clientes del laboratorio, organismos de acreditación y las autoridades reglamentarias cuando confirman o reconocen la competencia de los laboratorios (9).

Para la acreditación con esta norma ISO, el laboratorio debe:

- a. Disponer de personal directivo y técnico con la autoridad y los recursos necesarios para desempeñar sus obligaciones y detectar la existencia de desviaciones frente al sistema de gestión de la calidad o frente a los procedimientos de ensayo o calibración, así como para adoptar medidas que eviten o reduzcan al mínimo esas desviaciones.
- b. Disponer de las medidas oportunas para asegurar que ni la dirección ni el personal están sometidos a presiones e influencias externas o internas, ya sean comerciales, financieras o de otra índole, que puedan tener influencia negativa en la calidad de su trabajo.
- c. Disponer de políticas y procedimientos que aseguren la protección de la información confidencial y de los derechos de propiedad de los clientes, así como de procedimientos para proteger el almacenamiento y la transmisión electrónica de los resultados.
- d. Disponer de políticas y procedimientos que eviten su participación en actividades que puedan suponer una amenaza para la confianza en su competencia, imparcialidad, juicio o integridad operativa.
- e. Definir la organización y la estructura directiva del laboratorio, el lugar que ocupa en cualquier organización matriz y las relaciones entre la gestión de la calidad, las operaciones técnicas y los servicios de apoyo.
- f. Especificar las responsabilidades, la autoridad y las interrelaciones de todo el personal encargado de la dirección, realización o verificación de los trabajos que afectan a la calidad de los ensayos o calibraciones.
- g. Realizar una supervisión adecuada del personal que realiza ensayos y calibraciones, incluido el personal en proceso de formación, asignando esta labor a personas familiarizadas con los métodos y procedimientos,

- la finalidad de cada ensayo o calibración y la evaluación de los resultados de los ensayos o de las calibraciones.
- h. Contar con una dirección técnica que asuma la responsabilidad global de las operaciones técnicas y que disponga de los recursos necesarios para garantizar la debida calidad de las operaciones del laboratorio.
  - i. Designar a un miembro del personal como responsable de calidad que, al margen de sus otras obligaciones y responsabilidades, debe asumir la autoridad y responsabilidad de garantizar que el sistema de gestión de la calidad se implanta y aplica en todo momento. Este responsable de calidad debe tener acceso directo al nivel jerárquico más alto en el que se toman decisiones sobre la política o los recursos del laboratorio.
  - j. Designar sustitutos del personal directivo clave (8).

## **2. Sistema de calidad**

Dentro del sistema de calidad, se hace imprescindible que el laboratorio documente su política, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones, para asegurar la calidad de los resultados de las calibraciones, ensayos y productos. La documentación del sistema, debe ser comunicada al personal pertinente, debe ser comprendido por él, debe estar a su disposición, debe ser implementado por él (9).

El laboratorio debe disponer de una política de formación de su personal, debe mantener actualizada una descripción de cada uno de sus puestos de trabajo, donde indique, entre otros, la responsabilidad del puesto, los conocimientos y experiencia necesarios para su desempeño, así como las aptitudes y los programas de formación requeridos (9).

## **3. El manual de calidad**

Debe incluir la política del sistema de gestión del laboratorio, así como los objetivos generales, los cuales deben ser determinados y examinados por la autoridad de la alta dirección (9).

#### **4. La política de calidad**

Debe incluir los siguientes aspectos:

- a. El compromiso de la dirección del laboratorio con la buena práctica profesional y con la calidad de sus ensayos, productos y calibraciones durante el servicio a sus clientes.
- b. Una declaración de la dirección con respecto al tipo de servicio ofrecido por el laboratorio.
- c. El propósito del sistema de gestión concerniente a la calidad
- d. El requisito de que todo el personal relacionado con las actividades de ensayo y de calibración dentro del laboratorio se familiaricen con la documentación de la calidad e implementen la política y los procedimientos en su trabajo
- e. El compromiso de la dirección del laboratorio debe cumplir esta norma y mejorar continuamente la eficacia del sistema de gestión (7, 8).

#### **5. Control de documentos**

Se debe constituir y mantener un procedimiento, para el control de todos los documentos que forman parte del sistema de gestión, las normas y documentos normativos, métodos de ensayo o calibración, dibujos, el software, las especificaciones, las instrucciones y los manuales (9).

#### **6. Aprobación y emisión de documentos**

Los documentos que han sido distribuidos entre el personal de laboratorio como parte del sistema de gestión, deben ser revisados y aprobados para su uso, estableciendo una lista maestra de control de los documentos. En este procedimiento se identifica la vigencia de los documentos del sistema de gestión y su distribución, evitando de este modo el uso de documentos obsoletos o no válidos (9).

Dentro de los procedimientos o documentos adoptados se debe asegurar que las ediciones de éstos, estén disponibles en los sitios en los que se realicen las actividades y operaciones del laboratorio; se hace imprescindible su revisión periódica, para la realización de modificaciones que aseguren el cumplimiento con los requisitos técnicos vigentes. Los procedimientos o documentos que sean obsoletos, deben ser marcados y retirados de inmediato, para evitar su uso involuntario por parte del personal (9).

## **7. Cambios en los documentos**

Para la realización de los cambios a los documentos, se hace necesaria la revisión y aprobación por parte de quienes realizaron su aprobación y revisión original. El personal designado debe tener acceso a los antecedentes pertinentes sobre los que se basará su revisión y su aprobación (9).

Así mismo si es posible, se debe realizar una identificación del texto nuevo o modificado dentro del documento o en los anexos. También son necesarios los controles a las modificaciones realizadas a los documentos que se encuentran en sistemas informáticos, utilizando procedimientos que describan su realización y forma de control (9).

## **8. Acciones correctivas y preventivas**

Correctivas: cuando se ha identificado un trabajo no conforme o fuera de las especificaciones técnicas y procedimientos del sistema de gestión, el laboratorio debe establecer una política y procedimiento correctivo, designando personal capacitado que pueda realizar e implementar estas acciones correctivas.

Para la identificación de la acción correctiva adecuada, es necesaria la realización de un análisis de las causas del suceso, las acciones que deben ser seleccionadas e implementadas, deben ser aquellas que brinden una posibilidad mayor de eliminar el problema y prevenir su ocurrencia. Cuando se corrige una no conformidad, debe someterse a una nueva verificación para demostrar su conformidad con los requisitos (9).

Preventivas: el laboratorio debe determinar las acciones para eliminar las causas o potenciales fuentes de no conformidades o problemas para prevenir su ocurrencia. Se debe establecer un procedimiento documentado para determinar e implementar las acciones preventivas necesarias, así como un registro de los resultados de las acciones llevadas a cabo, que proporcione evidencia sobre la eficacia de la acción. En necesario hacer seguimiento y revisión de las acciones tomadas, con el fin de reducir la probabilidad de su repetición (anexo 3, cuadro No. 1. Registro de solicitud de acción correctiva y preventiva) (9).

## **9. Control de registros**

El laboratorio debe establecer procedimientos para la identificación, la recopilación, la codificación, el acceso, el archivo, el almacenamiento, el mantenimiento y la disposición de los registros de calidad (entre los que se deben incluir los informes de las auditorías internas, las revisiones por la dirección y los registros de acciones correctivas y preventivas) y los registros técnicos (9).

## **10. Registros técnicos**

Los registros técnicos hacen evidentes los resultados obtenidos, indicando que se realizan las actividades establecidas en los procedimientos documentados e instrucciones. Son una acumulación de datos e información resultante de la realización de los ensayos o calibraciones que indican el cumplimiento de los requisitos del sistema y de los especificados para los procesos (9, 10).

Los puntos donde hay que hacer especial énfasis son:

- La validación de métodos
- La verificación de la trazabilidad y el cálculo de incertidumbre de la medida en el caso de los laboratorios de ensayo.

- El contemplar la posibilidad de incluir interpretaciones y opiniones en los informes de ensayo (10).

Dentro de estos registros se encuentran los formularios, los contratos, las hojas de trabajo, los manuales de trabajo, las hojas de verificación, las notas de trabajo, los gráficos de control, los informes de ensayos y los certificados de calibración externos e internos, las notas, las publicaciones y la retroalimentación de los clientes.

El laboratorio debe conservar, por un período determinado los registros de las observaciones originales, de los datos derivados y de información suficiente para establecer un protocolo de control, los registros de calibración, los registros de personal y una copia de cada informe de ensayos o certificado de calibración emitido. Los registros correspondientes a cada ensayo o calibración deben contener suficiente información para facilitar, cuando sea posible, la identificación de los factores que afectan a la incertidumbre y posibilitan que el ensayo o la calibración sean repetidos bajo condiciones lo más cercanas posibles a las originales (9).

Cada registro debe incluir la identidad del personal responsable de la actividad, muestreo, o de la realización de cada ensayo o calibración y de la verificación de los resultados. Las observaciones, los datos y los cálculos se deben registrar en el momento de hacerlos y deben poder ser relacionados con la operación en cuestión. Cuando ocurran errores en los registros, cada error debe ser tachado, no debe ser borrado, hecho ilegible o eliminado, y el valor correcto debe ser escrito al margen. Todas estas alteraciones a los registros deben ser firmadas por la persona que hace la corrección (9).

## **11. Revisiones por la dirección**

Las revisiones realizadas por la dirección del laboratorio, tienen como fin asegurar la conveniencia, adecuación, eficacia, y eficiencia, del sistema de gestión con respecto a los objetivos de calidad, la política de calidad y las actividades de ensayo o calibración del laboratorio, así como la determinación

de realizar e implementar actividades de mejora y los cambios o acciones que sean necesarias.

La revisión debe tener en cuenta los siguientes elementos:

- a. Adaptabilidad de las políticas y procedimientos.
- b. Informes y reportes del personal directivo y de supervisión.
- c. Resultados de las auditorías internas recientes.
- d. Acciones correctivas y preventivas.
- e. Resultados de la auditorías externas.
- f. Documentación de quejas.
- g. Retroalimentación de los clientes (9).

## **F. Verificación de métodos normalizados o estándar**

Confirmación mediante la aportación de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos especificados (11). En el caso de metodología para análisis (o calibración), la verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación. La verificación es una práctica que se debe realizar de manera regular como parte del proceso de aseguramiento de la calidad (11,12).

La verificación de los métodos normalizados ó estándar se debe realizar según lo establece el control de calidad del método. Aún cuando se está adoptando un método normalizado, que se sabe fue validado y ampliamente probado, es necesario que en el laboratorio se empiece por verificar que éste funciona acorde a sus especificaciones. Esto debido a que los métodos analíticos implican procesos complejos, y que por ello son susceptibles al error humano, que siempre es necesario verificar que el laboratorio puede ejecutarlos correctamente (12).

### **1. Método normalizado o estándar**

Método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el

sector técnico correspondiente (13). Los métodos estándar son aquellos publicados por organizaciones internacionales, regionales o nacionales; por organizaciones técnicas respetables; referencias legales; métodos publicados por la FDA (Food and Drug Administration), y que se ejecutan tal como se describen en la norma (14).

Estos métodos incluyen aquellos publicados por:

- United States Pharmacopeia (USP)
- National Formulary (NF)
- Homeopathic Pharmacopeia of the United States
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC).
- American Public Health Association (APHA)
- Pesticide Analytical Manual (PAM)
- Food Additives Analytical Manual
- Food Chemicals Codex
- FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM)
- FDA Macroanalytical Procedures Manual (MPM)
- ORA Laboratory Information Bulletins (LIBs) (13, 14).

Se prefiere usar los métodos estándar, sin embargo es necesaria la verificación de la capacidad analítica dentro de los laboratorios en los cuales es usado. Un método estándar puede estar complementado con detalles adicionales sobre como los laboratorios deben proceder para asegurar una aplicación consistente (13).

Debe hacerse una autoevaluación o auditoría interna completa del sistema de gestión de calidad implantado, lo que permite a un equipo realizar por si mismo un diagnóstico del estado actual de una organización respecto de una norma o de una disposición establecida, puede hacerse de todos los procesos o de un sector en específico. El laboratorio debe concebir y formalizar los medios y métodos necesarios para evaluar el estado actual del sistema de gestión de calidad y así conocer su eficacia y el grado de cumplimiento (6).

## **2. Auditoría interna de calidad**

Es una evaluación cuantitativa del funcionamiento y efectividad del sistema de calidad (o del área de la organización), en base a listas de verificación y criterios bien definidos. Dentro de la organización se considera la auditoría de calidad como un instrumento necesario para mejorar continuamente el sistema de calidad y verificar que sus operaciones continúan cumpliendo con los requisitos del sistema de la calidad y de esta Norma. (COGUANOR NGR/COPANT/ISO/IEC 17025). El programa de auditoría interna se debe dirigir a todos los elementos del sistema de la calidad, incluyendo las actividades de ensayo o calibración (8).

El laboratorio debe implementar el aseguramiento de la calidad en todas las etapas del trabajo realizado. Estos deben ser planificados y revisados, pueden incluir, lo siguiente:

- Diseñar e implementar sistemas de control interno, como el uso habitual de materiales de referencia.
- Participar en programas de evaluación externa del desempeño (comparaciones interlaboratorios).
- Repetición de ensayos con el mismo, o con diferente método o con objetos almacenados de resultado confirmado.
- Coherencia de resultados para diferentes características de un objeto.

Un laboratorio debe simultáneamente implementar un sistema de control interno y participar en programas de evaluación externa de calidad. La realización, en conjunto, de ambas acciones permitirá al laboratorio identificar las fuentes de error, solucionándolas oportunamente y mejorando en forma continua la calidad de los servicios. Es labor de la dirección del laboratorio evaluar los resultados obtenidos en programas de control interno y externo, implementando las medidas correctivas cuando no se cumpla el criterio de control (1, 7, 9).

## **G. Aseguramiento de la calidad de los resultados**

### **1. Control interno de laboratorio**

El control de calidad interno consiste, en los procedimientos de control realizados por un laboratorio, para la evaluación continua de su trabajo. El principal objetivo es asegurar la coherencia de los resultados obtenidos diariamente y el cumplimiento de los criterios establecidos (15).

Un programa de controles periódicos es necesario para demostrar que controla la variabilidad (por ejemplo, entre analistas y entre equipos o materiales, etc.). Dicho programa debe abarcar todos los ensayos incluidos en el alcance de la acreditación del laboratorio. El programa puede incluir:

- El uso de muestras inoculadas.
- El uso de materiales de referencia (incluidos los materiales utilizados en ensayos de aptitud)
- Uso de replicados
- Muestras desconocidas para técnicos.

El intervalo entre estos controles dependerá del diseño del programa y del número de ensayos realizados. Es recomendable que, en la medida de lo posible, los ensayos incluyan controles para evaluar sus resultados como el control de calidad de equipos, el control de calidad de materiales de trabajo, el control de calidad de ambientes, el control de calidad de superficies, el cepario, entre otros (15).

#### **a. Control de calidad de equipos**

El enfoque integral de un sistema de calidad debe abarcar a todos los componentes y recursos de la organización, incluidos el suministro, manejo y mantenimiento de los artículos que se utilizarán en los procesos: equipos y materiales. Los equipos y materiales utilizados deben ser capaces de operar de modo uniforme dentro de los límites y estándares establecidos. Antes de su puesta en operación, tienen que haber sido apropiadamente calificados y

validados con el fin de prevenir el incumplimiento de las especificaciones de calidad requeridas (1, 16).

Se debe de tener cuidado especial con los materiales de referencia (pesas patrones, sondas patrones de temperatura, electrolitos patrones para pH, paneles de suero de referencia, etc.), que deben ser utilizados sólo como controles y comprobada su adecuación para los ensayos o calibraciones en que se usarán. También deberá comprobarse, antes de su puesta en uso, el funcionamiento correcto de cada lote de los reactivos que puedan influir en los resultados (16).

#### **i. Programa de mantenimiento**

Un programa de mantenimiento preventivo es esencial para asegurar la exactitud y longevidad del instrumento. Cuando se trabaja con equipos, es importante el mantenimiento, que puede ser preventivo o correctivo. El mantenimiento correctivo en algunos casos, es más costoso y puede tener efectos indeseables en las personas u organización. Ya que conforme los equipos envejecen, los costos de mantenimiento se incrementan, llegando a veces a límites que justifican su reemplazo (1).

El historial de cada equipo y las recomendaciones del fabricante son los elementos decisivos para definir un programa de mantenimiento preventivo. El éxito de dicho programa depende de la buena planificación, el uso de partes y repuestos especificados y el uso de herramientas apropiadas y de mano de obra calificada. Pero sobre todo de la decisión política y la disponibilidad de recursos financieros que permitan proveer los repuestos e insumos requeridos (1, 16).

El historial de cada equipo es el registro de todo lo que le ocurre: daños, reparaciones, mejoras, lubricaciones, ajustes, duración de las partes, entre otros. Una forma de garantizar la confiabilidad de los equipos consiste en aprovechar el ajuste rutinario para inspeccionarlos bien y detectar problemas.

Las fricciones, vibraciones, corrosión y erosión deben ser evaluadas con diligencia, porque generalmente son el indicio de algún problema mayor.

Los buenos hábitos como la limpieza de equipos y de los pisos facilitan la identificación de problemas y su corrección oportuna, previniendo problemas mayores. Por ejemplo, si el área del equipo está limpia, es más fácil detectar una pérdida de aceite. Asimismo, disponer de las herramientas esenciales a la mano y bien organizadas no sólo facilita su uso oportuno, sino que además revela cuando alguna se ha extraviado (1).

## **ii. Manual estándar de procedimientos operacionales**

El manual estándar de procedimientos operacionales, debe ser organizado por grupo de equipos. El listado de los equipos debe incluir: nombre, marca, modelo, número de serie, fecha de recibo y número de inventario de la institución (16).

El registro debe incluir el récord de mantenimiento preventivo, periodicidad de la inspección y fallas del instrumento, el cual debe estar accesible en todo momento con el fin de apoyar al personal que labora en los laboratorios de salud, clínicos o de investigación, salud ambiental, control de alimentos y control de medicamentos, en la comprensión de los requerimientos técnicos relacionados con la instalación, uso y mantenimiento de un grupo de equipos que resultan de gran importancia para la realización de las actividades diagnósticas o de investigación (16).

## **iii. Calibración de instrumentos**

La calibración es la comparación de un sistema de medición frente a estándares conocidos. Calibrar es comparar, no ajustar, aunque de una calibración se puede concluir que un equipo debe ser ajustado o corregido (1).

La calibración es la comparación del dispositivo o sistema de medición que tiene una relación desconocida con un patrón certificado con otro dispositivo o sistema al que se le denomina sistema de referencia (16).

El uso de un equipo que no cumple con los requisitos especificados puede dar mediciones inexactas, que a su vez podrían llevar a tomar decisiones equivocadas y muy costosas. Todo instrumento calibrado debe estar identificado con una etiqueta que indique la vigencia y aprobación de su calibración (16).

Todo plan de calibración implica:

- La evaluación de los equipos en uso para determinar su capacidad.
- La identificación de los requisitos de calibración.
- La programación de la calibración.
- El seguimiento de la programación.
- La definición del sistema de documentación y registro (16).

La frecuencia con que se debe calibrar un equipo varía, dependiendo de su uso y de las instrucciones del fabricante. Los registros de las mediciones diarias de los equipos en uso son una fuente importante para conocer si existe alguna falla en la precisión, exactitud y estabilidad de los dispositivos de medición que pudiera provocar que los procesos se salgan de control y en consecuencia alertar el programa de calibraciones (16).

#### **iv. Control de calidad de calibraciones**

Con el fin de poder controlar el cumplimiento del programa de calibración, todo equipo o instrumento calibrado debe identificarse indicando la vigencia de su calibración. Si el período de vigencia de la calibración ha expirado, el equipo no debe utilizarse hasta ser sometido a una nueva calibración (16).

La información que se debe registrar depende del equipo, pero en general se consignan los siguientes datos:

- Identificación del equipo.
- Fecha de la última calibración.
- Resultado de la calibración.
- Límites de error permitidos.
- Detalles de cualquier mantenimiento, modificación, ajuste, entre otros, realizado al equipo (16).

#### **b. Control de calidad de materiales de trabajo**

El control de calidad en un laboratorio microbiológico, debe evaluar y documentar el desempeño de todos los aspectos de sus procedimientos. Esto incluye la eficiencia de los reactivos y los medios de cultivo (17).

##### **i. Medios de cultivo**

El control de la calidad en la preparación y evaluación de los medios de cultivo, es considerado como esencial y buena práctica de laboratorio, necesaria para mantener el nivel y la ejecución de cualquier técnica microbiológica. Por lo anterior, está considerado como uno de los puntos críticos de control en el análisis microbiológico, del cual depende la seguridad de los resultados que emiten los laboratorios de ensayo (18).

Los medios de cultivo deshidratados son higroscópicos y la absorción de agua del exterior, así como la formación de agua dentro del envase como consecuencia de las fluctuaciones de temperatura en el ambiente, favorece el crecimiento bacteriano. Esto puede conducir al consumo de nutrientes, variaciones de pH y cambios en el color del medio. Además la exposición a la luz puede llevar a importantes alteraciones en los constituyentes del medio de cultivo (19).

Por lo tanto los medios de cultivo, deben almacenarse siempre en lugares frescos, a temperatura ambiente y protegidos contra la humedad y la luz. Se debe llevar un inventario con los medios, reactivos y suplementos que se tengan según el sistema primeras entradas, primeras salidas (PEPS). La

mayoría de los suplementos se guardan en refrigeración. Los medios de cultivo deshidratados en condiciones ideales (en su envase original a temperatura de 15 a 25 °C) generalmente se conservan durante 5 años (20). El material que ha sufrido cambios sustanciales, tales como hidratación, endurecimiento y cambio de color, debe descartarse (19, 21).

El grado de disolución de un medio deshidratado, así como la eficacia del mismo ya preparado, depende en gran medida del procedimiento empleado en la rehidratación. Se recomienda utilizar agua recién destilada o completamente desmineralizada y un erlenmeyer con el doble de capacidad, de la cantidad del medio que se quiere preparar. Si el medio va a distribuirse en tubos, debe agitarse constantemente para asegurar una adecuada homogenización al momento de servirlos. Cuando se va a esterilizar, se deben seguir las instrucciones de tiempo, presión y temperatura para la obtención de medios de cultivo óptimos. Una temperatura de 121°C, presión de 15 libras y un tiempo de esterilización de 15 minutos, son suficientes para la mayoría de los medios (21).

El medio esterilizado debe ser enfriado a 45°- 60°C en un baño de María, para evitar la formación de agua de condensación. Al ser vertidos en las placas Petri, evitar la formación de burbujas y coágulos. Durante el proceso de servida, debe tomarse una muestra del medio para realizar el control de calidad por esterilidad y eficiencia (21).

Los medios de cultivo reconstituidos tienen una vida útil limitada. Si no se emplean de inmediato, deben almacenarse bajo condiciones apropiadas para garantizar su utilidad durante un periodo de tiempo, si se trata de cajas de petri dentro de bolsa plástica (para evitar la desecación) duran aproximadamente 2 meses a 4°C, los medios en tubo con tapón hermético duran en refrigeración de 2 a 4 meses y aquellos que contienen tioglicolato, deben guardarse a temperatura ambiente. Los medios deben mantenerse preferiblemente en sitios oscuros, ya que la luz puede afectar algunos de sus componentes (21).

Debido que los medios almacenados en refrigeración, cuando pasan a temperatura ambiente tienden a formar agua de condensación en la superficie, se recomienda colocar las cajas petri en la incubadora a 35°C por 2 horas, colocándolos con el fondo hacia arriba para obtener una superficie seca. Esto es particularmente importante para que el agua no afecte la individualidad de las colonias en el cultivo. Se debe guardar un libro de registro de los resultados obtenidos (22, 23).

El control de funcionamiento del medio, consiste en comprobar la capacidad del medio, de recuperar un bajo número de microorganismos más sensibles para los que ha sido preparado, la capacidad de inhibir un alto número de los microorganismos que deben ser inhibidos en caso de los medios selectivos y de diferenciar los microorganismos para los que ha sido diseñado en caso de los medios diferenciales. Pueden utilizarse cepas bacterianas de referencia como control. Se rotulan todos los medios preparados, tanto en placas de Petri como en tubos, indicando, la fecha de preparación, expiración y número de lote (23, 24).

El laboratorio debe asegurarse que los medios de cultivo que provienen de empresas certificadas según ISO 9000, tengan el certificado de calidad, y que la certificación cumple todas las operaciones relevantes, incluyendo la de suministro y entrega. A pesar de no ser obligatorio, para sentir más confianza, el laboratorio puede decidir incluir también en el control del funcionamiento de los medios de cultivo según la carga de trabajo, una buena medida intermedia puede ser hacerlo solo en algunos lotes elegidos aleatoriamente (23, 24).

Si los medios de cultivo provienen de empresas no certificadas por la norma ISO, o no cumplen con las especificaciones de calidad recomendadas, el usuario debe realizar control completo para los medios preparados en el laboratorio de todos los lotes que se reciben; cualquier deficiencia en el aspecto físico, (esterilidad, no crecimiento de la cepa deseada, o no inhibición de la cepa no deseada), será documentada y notificada a los fabricantes

para que emprendan las medidas correctivas. El laboratorio debe mantener el control de calidad de estos medios hasta que el problema quede resuelto (24).

- **Pruebas básicas de control de calidad de medios preparados**
  - pH
  - Esterilidad
  - Capacidad de crecimiento y reacción
  - Estabilidad
  
- **Criterios de calidad de medios preparados**
  - Rajadura del plato o envase
  - Rajadura en la superficie del medio
  - Variaciones en el volumen del medio
  - Cristales en el medio
  - Presencia de burbujas
  - Cambio de color normal
  - Contaminación
  - Falla en la inhibición de microorganismos saprófitos (23, 24).
  
- **Fallas en la preparación de medios de cultivo y sus causas**
  - **Valor de pH incorrecto**
    - Cuando se mide el pH por encima de los 25°C.
    - Sobrecalentamiento en la esterilización, vuelta a fundir o calentamiento prolongado a 50°C.
    - Solución incompleta del medio.
    - Mala calidad del agua.
    - Recipiente mal lavado o con residuos químicos.
    - Mala conservación del medio deshidratado o vencido.
  
  - **Turbidez o precipitación**
    - Mala calidad del agua.
    - Sobrecalentamiento.

- pH incorrecto.
- Solución incompleta.
  
- **Oscurecimiento**
- Sobrecaentamiento.
- Solución incompleta.
- Alteración del pH.
  
- **Gel blando**
- Bajo porcentaje de agar en el medio.
- Errores en la pesada del medio deshidratado o en los suplementos.
- Sobrecaentamiento.
- Mala homogenización del medio.
- Exceso de agua.
  
- **Crecimiento bacteriano pobre**
- Exceso de calentamiento.
- Sustancias inhibidoras en el agua o en el recipiente.
- Alteración en el pH (23- 25).

## ii. **Reactivos y colorantes**

La clasificación correcta de las bacterias de acuerdo a las reacciones bioquímicas, dependen de la pureza, reactividad y estabilidad de los reactivos, la concentración de las soluciones por efecto de la evaporación de los solventes o las variaciones introducidas en los métodos recomendados, puede afectar los resultados de modo adverso. Este es el caso de las tinciones para diferenciar bacterias por su reacción al Gram y la morfología bacteriana, tinción para cápsulas, esporas, entre otras (26).

El control de calidad de los colorantes, debe realizarse primero con cada nuevo lote preparado; luego es suficiente con un control aleatorio, para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso.

Para facilitar el control de los colorantes, se recomienda preparar láminas con microorganismos aislados en el trabajo rutinario, utilizando cepas frescas,

tomando en cuenta los microorganismos que pudieran ser más útiles según la tinción que se evalúa (26).

## ▪ **Pruebas de identificación y confirmación**

### **- Tinción de Gram**

Los fundamentos de la técnica se basan en las diferencias entre las paredes celulares de las bacterias Gram positivo de las Gram negativo. El complejo de color formado con la pared de las bacterias Gram positivo no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol acetona, la célula permanece de color azul violeta , en cambio las bacterias Gram negativo, al decolorarse con el alcohol acetona se dejan colorear con safranina quedando de color rosado.

A continuación se mencionan algunas causas de error durante la tinción de Gram:

- El cristal violeta tiende a hacer precipitación, lo cual puede ser causa de observación de estructuras ficticias en el frotis.
- La evaporación puede ser causa de mal funcionamiento de los colorantes.
- Los portaobjetos que no han sido previamente limpiados o con restos de grasa, pueden ser causa de mala fijación y tinción de la muestra.
- Sobrecalentamiento de la muestra en el portaobjeto durante la fijación, el exceso de calor provoca un daño físico en la pared celular de las bacterias que puede afectar la retención de los colorantes.
- Lavado muy fuerte del portaobjetos con la preparación durante la tinción.
- Proporción no adecuada de los componentes de la tinción (20, 23, 26).

### **- Oxidasa**

En esta prueba, el objetivo es buscar la presencia de la enzima *Citocromo C oxidasa*. Se trata de un enzima que oxida el *citocromo C* de la cadena transportadora de electrones. Este se detecta utilizando el *tetrametil-p-fenilendiamina*: el reactivo de oxidasa contiene este compuesto que va a ser

oxidado por la *citocromo C oxidasa*. En estado reducido es incolora, pero cuando se oxida vira a púrpura (24).

#### - **Indol**

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptofano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptofano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de algunas especies de microorganismos (*E. coli Haemophilus influenzae*, entre otras). La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del *p*-dimetilaminobenzaldehído. El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptófano (24).

#### - **Rojo de Metilo, Voges Proskauer (MRVP)**

El rojo de metilo es una de las características taxonómicas que se utilizan para identificar los diferentes géneros de enterobacterias lo constituyen el tipo y la proporción de productos de fermentación que se originan por la fermentación de la glucosa. Se conocen 2 tipos generales: La fermentación ácido-mixta y la fermentación del 2,3 butanodiol. En la fermentación ácido mixta se forman fundamentalmente láctico, acético y succínico, además de etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. En la vía del butanodiol se forman cantidades menores de ácido (acetato y succinato) y los principales productos son el butanodiol, etanol, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido mixta (26).

#### - **Pruebas bioquímicas para enterobacterias**

- MIO (Motilidad-Indol-Ornitina): esta prueba bioquímica permite identificar bacterias de acuerdo a su motilidad a la reacción de Indol (reacción positiva anillo de color rojo) a la descarboxilación de la ornitina.

- TSI (Triple Azúcar Hierro): es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la identificación de la producción de  $H_2S$ . Esta es una prueba específica para la identificación a nivel de género en la familia *Enterobacteriaceae*.
- LIA (Agar Lisina Hierro): permite diferenciar los microorganismos que producen descarboxilación o desaminación de la lisina. Se puede detectar además la producción de  $H_2S$  y es más sensible que el TSI para la detección de  $H_2S$ . Es muy utilizado para descartar *Salmonella* de aislamientos primarios.
- Citrato: la utilización de este, como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias, mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol (24 - 26).

#### - **Agua desmineralizada**

El agua desmineralizada se usa en los análisis de laboratorio y en métodos químicos. Por sus óptimas características y garantía de análisis se puede usar en la dilución de muestras, preparación de soluciones valoradas para calibración de instrumentos analíticos, preparación de reactivos, limpieza de materiales y equipos, debe ser almacenada entre 15 y 30°C, y protegida de la luz, es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, los envases que la contienen deben mantenerse bien cerrados, las extracciones frecuentes de pequeñas cantidades pueden ocasionar la contaminación del contenido, debe tener un control de calidad básico que incluye parámetros físicos y químicos (anexo 4, tabla 1. Propiedades físicas y químicas del agua desmineralizada) (27).

#### c. **Control de calidad de ambientes**

El aire es mezcla de nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono con vapor de agua y en suspensión se encuentran numerosas partículas inertes de polvo (las más peligrosas y numerosas son inferiores a 5 micras y se representan en

concentraciones superiores a millones por litro en aires confinados), humos, otras impurezas y, lo que es más importante, una flora y fauna denominada aeroplancton. Ácaros, polen, esporas y microorganismos son componentes naturales del aire, y están inmersos en un ascendente impacto en la salud humana, desde tres puntos de vista: alergias, infecciones e intoxicaciones (28).

Los laboratorios y las fábricas de medicamentos son especialmente sensibles a la presencia de todo tipo de aeroplacton contaminante, por lo que deben ser los más estrictos en su control. Los contaminantes biológicos del aire se pueden clasificar en: bacterias, levaduras, mohos, virus, protozoos (amebas) y artrópodos (ácaros). Los subproductos biológicos pueden ser: polen, esporas, cabellos, caspa, excremento, cadáveres de insectos, arácnidos, madera, papel, plumas. El origen de estos contaminantes biológicos, por orden decreciente de importancia son: las personas que son la fuente más impresionante de contaminantes biológicos, polvo, entrada de aire exterior mal ubicada junto a la salida del aire interior (28).

La proliferación de estos contaminantes biológicos se da en las zonas húmedas del edificio (agua estancada en bandejas de recolección que no drenan y proceden de torres de refrigeración, humidificadores entre otros, filtros de aire, cortinas textiles, pinturas porosas).

Las medidas preventivas para disminuir tanto el origen como la proliferación de contaminantes biológicos deben ser: menor densidad de población por sala, limpieza y desinfección, no incluyendo aire exterior contaminado biológicamente, manteniendo condiciones de humedad relativa ambiental no superiores al 70%, eliminando las goteras e infiltraciones inmediatamente que se detectan, mantenimiento de filtros para que no se rompan (28).

No se consideran solamente como agentes biológicos a aquellos microorganismos capaces de producir enfermedades infecciosas, sino además aquellos microorganismos o subproductos biológicos que pueden originar

alergias o toxicidad. El ámbito de aplicación es cualquier trabajo en que se pueda estar expuesto a agentes biológicos (28).

### **i. Bacterias en el ambiente**

Las bacterias son microorganismos que se encuentran clasificados en dos grupos: archaeobacterias y eubacterias. Son dos grupos bioquímicamente diferentes y reaccionan de forma diferente. Las archaeobacterias viven en ambientes extremos, algunas carentes de oxígeno, en aguas termales (termofílicas), otras en aguas salinas (halofílicas) o ácidas (acidofílicas).

Algunas de estas bacterias también son productoras del gas metano y pueden encontrarse en las plantas de tratamiento de aguas usadas. Las eubacterias pueden ser fotosintéticas y obtienen su energía de la luz solar, (como sucede con las cianobacterias), otras bacterias consumen productos orgánicos y otras mediante la descomposición de sustancias inorgánicas, (como por ejemplo los compuestos nitrogenados). Pueden vivir como parásitos, (alimentándose de otros organismos vivos), o como saprófitas, (alimentándose de organismos en estado de descomposición) (29).

Las bacterias se diferencian por su capacidad de producir ciertas toxinas que son sustancias de naturaleza proteica que dan origen a lesiones o síntomas de su acción característica, al invadir un organismo vivo. Estas toxinas pueden ser excretadas en el ambiente, recirculando en el aire (29).

### **ii. Géneros bacterianos aislados en el aire**

Dentro de los géneros bacterianos encontrados en el aire con frecuencia están las bacterias gram positivo, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus* y *Actinomyces*, ampliamente relacionadas con cuadros infecciosos de vías respiratorias. De las que no se encuentran con mucha frecuencia están las gram negativo entre las que destacan: *Klebsiella* sp; *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp, y *Serratia* sp (30).

### **iii. Mohos y levaduras en el ambiente**

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como flora normal de un alimento, o como contaminantes en equipos mal sanitizados. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento. Los hongos y levaduras pueden utilizar ciertos sustratos como pectinas, carbohidratos como polisacáridos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos (31).

También pueden causar problemas a través de: síntesis de metabolitos tóxicos (micotoxinas), resistencia al calor, congelamiento, antibióticos o irradiación y habilidad para alterar sustratos no favorables permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Pueden también causar malos olores en los ambientes (31).

### **iv. Muestreo microbiológico del aire**

El muestreo requiere coleccionar una porción de aire de volumen conocido que contenga una fracción representativa de las partículas presentes en el ambiente y se lleva a cabo para cuantificar e identificar los bioaerosoles alérgicos o patógenos, además del diagnóstico y tratamiento de enfermedades de seres humanos y vegetales. Esto debe realizarse con un gran rigor científico por el impacto que puedan tener los resultados obtenidos para la sociedad. Ningún método de muestreo por si solo es conveniente para coleccionar y analizar todos los tipos de aerosoles y en la actualidad no se dispone de protocolos estandarizados (32).

Hasta la fecha no se ha encontrado ninguna técnica de identificación perfecta para las esporas fúngicas, sin embargo, se utilizan medios de cultivo como son Agar Conteo en Placa mas Cloranfenicol, Saboraud, Czapek, Extracto de Malta entre otros y la identificación visual tanto microscópica como macroscópica como métodos de identificación (33).

- **Método volumétrico por impactación**

El uso de este método permite la separación de partículas del torrente de aire utilizando la inercia de las mismas para forzarlas a su deposición en una superficie sólida o semisólida. La superficie de colecta es generalmente un medio de cultivo agarizado o un portaobjetos de vidrio cubierto de una sustancia adhesiva, aunque se pueden utilizar medios líquidos (31, 33).

Este método se lleva a cabo a través de equipos llamados bio colectores que absorben aire definido. El objetivo de utilizar un bio colector es la remoción y colección de partículas biológicas del aire de manera que no afecte la integridad biológica de los microorganismos colectados. La capacidad de colección de estos equipos depende de su forma física y de las características fisiológicas del microorganismo (31, 33).

- **Método no volumétrico**

En el método de muestreo no volumétrico, también como método de sedimentación, de gravedad o de muestreo por deposición, se utilizan placas de petri abiertas que contienen un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de hongos, los cuales son colectados por gravedad. Este procedimiento es muy utilizado debido a su bajo costo y fácil manejo, este método solo se recomienda para monitoreo (31, 33, 34).

- **Condiciones de cultivo e incubación**

Los microorganismos que son colectados en una superficie de agar nutritivo por impactación pueden ser cultivados directamente, mientras que los que son colectados en líquido o en un filtro o son transferidos a un medio de cultivo. Debido a las diferencias en temperatura, tiempo de incubación y requerimientos nutricionales, ningún medio de cultivo es satisfactorio para el aislamiento simultáneo de bacterias y hongos del aire. El desarrollo del hongo está determinado por factores físicos tales como temperatura, humedad y luz; pero lo primero que determina si un hongo crece, es la cantidad de agua disponible que exista para ese hongo (31, 33, 34).

En un ambiente interior los medios más adecuados para una eficiente colecta son Agar Conteo en Placa con Cloranfenicol (PCA), Agar Extracto de Malta (AEM) y Agar Papa Dextrosa (PDA) + 75 % NaCl, mientras que para lograr una buena representación de la microbiota contaminante; Agar Extracto de Malta y Agar Sabouraud Dextrosa son los más indicados y para lograr una buena representación de la microbiota bacteriana y para los niveles de contaminación son recomendables los medios Agar Nutritivo, Agar Triptona Soya y Agar Conteo en Placa (31, 33).

#### **v. Clasificación de ambientes de laboratorio**

El ambiente limpio es una sección especial en la cual se controla de manera eficiente la cantidad de partículas suspendidas en el aire, así como contaminantes líquidos y sólidos tóxicos, este se divide en clases dependiendo del número de partículas que se encuentran en el aire por metro cúbico (35).

Los ambientes de laboratorio se clasifican según la pureza del aire, la clase 1 es la más limpia de todas, pues solo tiene un mínimo de 35 partículas por metro cúbico, le sigue la clase 10 que tiene 352 partículas por metro cúbico, la clase 100 tiene 3,520 partículas por metro cúbico, la clase 1000 tiene 35,200 partículas por metro cúbico, la clase 10,000 tiene 352,000 partículas por metro cúbico, mientras que la clase 100,000 es la que permite un rango más amplio de partículas en el ambiente 3,520,000 partículas por metro cúbico, sin embargo, hay que hacer notar que un ambiente limpio es 10,000 veces más limpio que una sala de operación de cualquier hospital, pues se requiere de alta tecnología para mantener la calidad de limpieza, como los sistemas de filtración de aire que permiten cambiar completamente el aire de los cuartos limpios hasta 10 veces por minuto. Para mantener el ambiente limpio se necesita que el personal que trabaja en esos espacios use uniformes especiales para evitar cualquier contacto humano con el análisis que se realiza (anexo 5, tabla No. 2. Clasificación ISO, según número de partículas en el ambiente) (35).

#### **d. Control de calidad de superficies**

Con el objetivo de reducir el riesgo de contaminación y facilitar las labores de limpieza y desinfección, se recomienda que las superficies de trabajo sean suficientemente espaciosas, para que se mantengan limpias y ordenadas. El espacio requerido dependerá del volumen de análisis realizado y de la organización interna del laboratorio (31).

En los laboratorios los medios de cultivo, los reactivos y las muestras a trabajar, entran en contacto con diversas superficies, recipientes, paletas, y otros utensilios afectando la calidad y seguridad de los análisis realizados. Entre las medidas de un programa de garantía de calidad microbiológica debe incluirse un plan de limpieza y desinfección frecuente de todas las superficies mencionadas. Condicionalmente el equipo y el medio ambiente deben ser diseñados adecuadamente (evitando grietas o espacios muertos) para que un programa efectivo de limpieza y desinfección, sea el método de control fundamental de las vías de contaminación de esas superficies (31 - 33).

Se debe prestar atención a la limpieza y desinfección de superficies inertes que están formadas por las partes externas ó internas de los equipos y utensilios que están en contacto directo con las muestras a ser trabajadas en el laboratorio, por ejemplo: (campana de flujo laminar), equipos, mobiliario, utensilios, entre otras. Además de llevar a cabo el plan de limpieza y desinfección, es necesario evaluar periódicamente la eficacia de dicho plan. Esto es necesario para descubrir las deficiencias en el procedimiento de limpieza y desinfección con el objeto de tomar las medidas correctivas adecuadas (33, 34).

#### **i. Examen microbiológico de superficies**

La necesidad de mantener en estado higiénico las superficies que entran en contacto con los productos analizados en el laboratorio, tiene una importancia evidente para procesar las muestras en un ambiente estéril y dar resultados satisfactorios (36).

Esto conduce a la necesidad de desarrollar técnicas que permitan valorar de forma adecuada el estado microbiológico de las superficies. Los métodos más usados en la valoración higiénica de superficies durante la manipulación de productos son los siguientes:

- **Técnicas de impresión**

Se basan en el empleo de un agar de contacto. Este es un medio de cultivo sólido que se oprime sobre la superficie de área conocida (plana o casi plana) a estudiar y después se retira, los resultados pueden expresarse como número de UFC/25 cm<sup>2</sup>. Debido a la humedad de la superficie del agar una parte notable de las bacterias, esporas y otra flora presente quedará adherida al mismo al retirarlo de la superficie. Posteriormente se incuba el agar de contacto (entre los agares de impresión más utilizados están las placas de Rodac), después de 24 horas se procede al recuento de colonias (36).

Estas técnicas sólo recuperan una parte de los microorganismos presentes, ya que una parte de ellos continúa adherido a la superficie estudiada tras retirar el agar de impresión. En este sentido, las técnicas destructivas (técnicas que destruyen la muestra, como la homogeneización) son más exactas. Sin embargo, los resultados de las técnicas de impresión deben evaluarse de modo semicuantitativo y relativo. De este modo, si informan del estado higiénico de las superficies estudiadas y son ampliamente utilizadas para este tipo de muestreos (36).

- **Técnicas de frotado**

Consiste en el frotado sistemático de una porción medida de la superficie (suelen ser 25 cm<sup>2</sup>) con hisopo de algodón. Después el hisopo se deja reposar sumergido en un volumen conocido de agua de peptona y se agita a intervalos para que vaya desprendiendo los microorganismos que se le hayan adherido al frotar. Después se vierte 1 mL de la muestra en placas con el agar para el recuento total de bacterias y recuento de coliformes. Se incuba a 35.5 - 37.5°C

por 24 - 48 horas, se realiza el recuento y se hacen los cálculos pertinentes (33).

- **Técnicas de lavado**

Suelen usarse para recuento en superficies interiores de recipientes (cristalería de laboratorio). Se introduce un volumen grande de agua de peptona en el recipiente a estudiar, se agita para lavar bien su interior y se extrae el agua de peptona. Se siembran alícuotas de 1 mL de esta agua de peptona en placas de PCA y se incuban a 35.5 - 37.5°C para recuento de aerobios mesófilos. Si es necesario. Los recuentos obtenidos pueden expresarse como número de UFC por recipiente (33).

Se puede decir que los valores obtenidos siempre serán inferiores a los reales porque los microorganismos bien adheridos a la superficie del recipiente no se desprenderán al agitar con el agua de peptona. Sin embargo, concediendo un valor relativo a los recuentos obtenidos, la técnica permite controlar el estado higiénico de los recipientes (33, 34, 36).

- e. **El cepario**

Los sistemas de verificación son los procesos que se requieren para asegurar que los parámetros de funcionamiento de los test, tanto comerciales como los de uso doméstico, son los esperados y las pruebas pueden ser utilizadas como métodos de diagnóstico en el laboratorio. La mayoría de los procedimientos en microbiología, dependen de que los microorganismos viables en el cultivo sean capaces de mantener sus características morfológicas, fisiológicas y que sean típicas y reproducibles. Para ayudar en este control, las cepas estándar de control de calidad, son un componente esencial de un proceso de verificación (37).

Existen varias colecciones de cepas utilizables para el control de calidad. Algunos ejemplos son:

- **ATCC:** American Type Culture Collection- Rockville, USA.
- **NCIC:** National Collection of Industrial Bacteria- Survey, Inglaterra.

- **JFCC:** Japanese Federation of Culture Collection of Microorganisms Japan.
- **CNCM:** Collection Nationales de Cultures de Microorganismes.
- **CCTM:** Colección Nacional – Lille, Francia (38).

Los organismos que han de ser utilizados en el control de equipos o sistemas de identificación, generalmente son estipulados por los fabricantes o bien escogidos por el usuario. Generalmente se utilizan cepas de referencia como las ATCC (37).

Las cepas de referencia que pueden ser utilizadas para confirmar la identificación de bacterias aisladas, son cepas que se encuentran perfectamente caracterizadas por diferentes metodologías y conservadas por diferentes técnicas en las cuales permanecen con sus características autóctonas intactas. Además, también se utilizan para verificar el cumplimiento de las normas de calidad y demostrar la trazabilidad, el laboratorio debe utilizar cepas de referencia de microorganismos suministrados por una colección nacional o internacional reconocida. Las cepas de referencia deben cumplir con los requisitos siguientes: características típicas, características estables y reproducibilidad de cepas (39).

#### **i. Métodos de conservación de cepas bacterianas**

Los métodos de conservación de las cepas estándar de control de calidad, deben asegurar que las mismas mantengan sus características típicas y que puedan ser reproducidas después. El medio utilizado para su conservación debe mantener un mínimo de mutaciones. Estas mutaciones pueden evitarse permitiendo el mínimo crecimiento del microorganismo y aportando óptimas condiciones ambientales para su sobrevivencia, con el menor número de sub-cultivos (38).

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son, que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el

proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las cepas, y por último; que estas permanezcan genéticamente estables (39).

Los dos primeros objetivos no son muy difíciles de conseguir cuando se conoce bien la técnica microbiológica, pero el tercero puede presentar dificultades, y este es el motivo por el cual existen varios métodos de conservación para los microorganismos, y ninguno de ellos es de uso general. Estos métodos se agrupan en tres apartados, que son: métodos de elección o de conservación a largo plazo, métodos alternativos y métodos restringidos (39).

- **Métodos de elección o de conservación a largo plazo**

Son los mejores porque en ellos se paraliza el crecimiento de las células microbianas, pero éstas no han muerto. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética, para evitarse la aparición de generaciones sucesivas. Aún así no se puede descartar algún cambio originado por el método preparatorio en sí mismo. Los métodos de conservación pertenecientes a este grupo son: congelación y liofilización (38, 39).

- **Conservación por congelación**

Se congelan las cepas en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. Cuando se quiere trabajar con las cepas así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir un congelador con temperatura estable, ya que existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más engorroso para realizar el envío de las cepas (38, 39).

### - **Conservación por liofilización**

Consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismos y eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo sin pasar por el estado intermedio líquido. Con ello la estabilidad genética es alta, pero a veces no tanto como en la congelación (39, 40).

#### ▪ **Métodos alternativos**

Son los que se utilizan cuando no se pueden emplear los métodos de elección, bien por carecer de los equipos necesarios, o porque la cepa microbiana no resiste los tratamientos de la conservación por estos métodos. Conviene tener en cuenta que nunca se debe usar un único método alternativo, sino que se recomienda conservar el microorganismo empleando varios de los métodos que a continuación se describen (38- 40).

### - **Conservación por transferencia periódica**

La cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celular, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco. Si se va a utilizar este método es aconsejable retardar el envejecimiento y alargar los periodos entre dos resiembras (37, 38).

Esto se puede conseguir de varias maneras como por ejemplo: disminuyendo la cantidad de inóculo; rebajando la proporción de algunos nutrientes en el medio de cultivo; inoculando en picadura los microorganismos que son anaerobios facultativos, ya que el crecimiento en presencia de oxígeno es más rápido y origina productos generalmente tóxicos; y almacenando los cultivos a 4 - 8°C (37, 38).

A veces también se suele recubrir el crecimiento con una capa de aceite mineral estéril. Para evitar en la medida de lo posible la desecación del medio de cultivo, que podría ser tóxico para las células al aumentar su

concentración. Los microorganismos muy aerobios, como por ejemplo los hongos filamentosos, no se pueden guardar en tubos completamente cerrados. Por último, otro inconveniente que tiene la transferencia periódica es que la contaminación de los cultivos resulta más fácil al tener que manejar los tubos a lo largo del tiempo y también por la posibilidad de entrada de ácaros en los mismos (37, 39).

- **Conservación por suspensión en agua destilada o en agua de mar estéril**

Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias. Consiste en suspender en agua estéril una porción del cultivo que se quiere conservar. Se pueden preparar en criotubos de los anteriormente mencionados. En este caso la concentración de microorganismos no debe ser superior a  $10^4$ - $10^5$  microorganismos/mL en el caso de bacterias y levaduras. Para los hongos filamentosos que no esporulan, se pueden poner en suspensión trocitos de agar con el crecimiento del hongo (37).

▪ **Métodos restringidos**

En este grupo se engloban métodos no empleados habitualmente, pero a los que es necesario recurrir a la hora de conservar grupos de microorganismos muy determinados que no resisten bien la liofilización o la congelación, como por ejemplo los géneros bacterianos *Spirillum*, *Rhodospirillum*, entre otros (40).

▪ **Cultivos de trabajo de diario**

Los cultivos control para el trabajo diario, son una forma conveniente para realizar el control de calidad de pruebas de uso frecuente y que requieren una lectura comparativa. Tal es el caso de las pruebas de coagulasa y oxidasa, entre otras. Para este propósito se utilizan cultivos de 24 horas que son aislados y cultivados diariamente (37).

### - **Bacterias anaeróbicas**

Los cultivos para trabajo diario de la mayoría de las bacterias anaeróbicas, pueden ser mantenidos en medio de carne cocida o en Tioglicolato con 0.5% de carbonato de sodio adicionado después de esterilizar por autoclave. Los cultivos se incuban por 24 a 48 horas y son guardados a temperatura ambiente (37).

### ii. **Mantenimiento del cepario**

Se debe tener especial cuidado en el mantenimiento del cepario, ya que el mismo constituye una ayuda importante en la verificación de equipos, materiales, reactivos y habilidad del personal. Debe existir un programa metódico de trasplantes de cepas, archivo de cada uno de los cultivos con sus características bioquímicas, origen de la cepa, método de identificación, fecha de siembra, próximo trasplante, método de conservación, número de viales y personal responsable (37, 40).

Las cepas de referencia se deben reconstituir y someter a los controles de pureza y ensayos bioquímicos que sean necesarios. Deben ser subcultivadas en los medios apropiados una sola vez para obtener las cepas de reserva y las cepas de trabajo (41).

En un medio adecuado para la congelación (por ej: Caldo Trypticasa Soya con Glicerol 10-15% v/v) pueden mantenerse indefinidamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  y entre  $-50$  y  $-70^{\circ}\text{C}$  por 1 año. Todos los viales deben ser identificados con la cepa, procedencia y fecha de congelación. Cuando se descongelan las cepas de reserva no se deben volver a congelar y reutilizar. Por eso deben congelarse suficiente número de viales de cada cepa, para poder disponer de cepas de trabajo (41).

Las cepas de trabajo se obtienen por subcultivo de las cepas de reserva en medios sólidos apropiados para cada microorganismo (Ejemplo: Agar Chocolate, Agar Sangre, entre otros). Estas cepas se conservarán en refrigeración  $2-8^{\circ}\text{C}$  o a temperatura ambiente durante un período de tiempo

que asegure la viabilidad del microorganismo, no más de un mes. Siempre se debe verificar la pureza y la morfología típica colonial del subcultivo (41).

En general, las cepas bacterianas de trabajo, pueden ser subcultivadas hasta un número determinado de veces (máximo 3), cuando el laboratorio pueda aportar evidencias documentadas que demuestren que no se ha producido pérdida de viabilidad, cambios en la actividad bioquímica o cambios en la morfología. Las cepas de trabajo no deben ser subcultivadas para sustituir a las cepas de reserva. Todas las fases del proceso deben estar perfectamente documentadas y debe mantenerse un registro detallado de todas las operaciones realizadas (41).

### **iii. Transporte de cepas bacterianas**

El personal que prepara éste envío debe ser entrenado en las formas de empaque y en las regulaciones internacionales que lo rigen. Generalmente el transporte de agentes etiológicos requiere un doble o triple empaque, dependiendo de las regulaciones del país de destino. Si la cepa está contenida en un tubo de vidrio, se recomienda que sea pequeño y de vidrio grueso (37).

Este a su vez debe estar inmerso en un envase de metal con material aislante como el aserrín o foam desmenuzado. A éste envase se le puede adicionar otro que contenga igualmente aserrín o foam, dependiendo de las regulaciones y por último la caja externa no porosa, con recubrimiento de cera en su interior a prueba de derrame. En ésta caja deben ir las etiquetas, guía aérea, etiquetas de advertencia, números telefónicos para contactar en caso de emergencia, tanto en el país de origen como en el de destino. Igualmente se deben etiquetar con un símbolo de material peligroso de color rojo (37, 42).

## **2. Control de calidad externo**

Es recomendable que los laboratorios de microbiología puedan participar en programas de evaluación externa. Estos programas miden la capacidad del laboratorio para evaluar un desconocido y llegar a un resultado seguro (43).

Entre estos programas está la acreditación del laboratorio, que es un procedimiento por el cual una autoridad reconoce formalmente que un organismo es competente para realizar tareas específicas. Certificar un laboratorio es reconocer de manera formal la aptitud de su organización para gerenciar la calidad (43). Acreditar un laboratorio es reconocer de manera formal su aptitud para prestar los servicios o pruebas analíticas que tienen acreditados asegurando su calidad. La acreditación ISO además de la conformidad con la organización garantiza la competencia técnica del laboratorio para los servicios concretos acreditados (6).

La calidad está enfocada no solo en los aspectos técnicos, sino también en los administrativos, racionalización de recursos, planificación gerencial, costos de operaciones, calidad de servicio al cliente, es decir, un enfoque de calidad total. El enfoque moderno en un mundo en que las distancias se han acortado y los conceptos de globalización son una realidad, la acreditación proporciona a los miembros la posibilidad de comunicarse mejor con otros laboratorios, lo cual permite un intercambio de experiencias en metodologías, compra de equipos, entrenamiento de personal entre otras (9, 43, 44).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

En un laboratorio de análisis microbiológico industrial, la documentación juega un papel importante, porque contempla las técnicas, principios y métodos, de todos los procedimientos y actividades que se realizan a diario. Igualmente en la dinámica de un laboratorio de esta índole, se requiere permanente actualización, que implica procesos de eliminación, modificación y creación de documentos. Esta documentación se debe apoyar en las normas ISO 17025, porque así, los documentos que se generen, ayudarán a establecer parámetros de credibilidad, confiabilidad, autoridad y reconocimiento, e internamente garantizarán la optimización de los procedimientos, conduciendo a la exactitud de los resultados y las consecuentes mejoras de la relación costo/beneficio.

Lo expuesto anteriormente, sumado a que el laboratorio de Microbiología de Referencia de la Universidad de San Carlos de Guatemala –LAMIR-, es un ente adscrito a la academia y presta un servicio de análisis microbiológico a la industria nacional, es necesario actualizar para cumplir con los requerimientos establecidos en la norma ISO-NTC-IEC- 17025 y que cumpla con los requisitos de las autoridades reguladoras de Guatemala, OGA (Organización Guatemalteca de Acreditación). Beneficiándose al realizar las actividades de forma sistemática, reduciendo costos intralaboratorio, confianza del laboratorio en sus resultados y reportes generados, con el fin de satisfacer las necesidades del cliente.

Es necesario llevar un sistema de auditorías internas, para conocer el grado en que un sistema de gestión de calidad cumple dentro de un laboratorio con la norma de calidad adoptada, además llevar controles de calidad internos entre ellos, el ambiente de laboratorio, los análisis de superficies de los puntos críticos definidos de acuerdo a las condiciones internas del laboratorio, el control de esterilidad del autoclave, el seguimiento y mantenimiento de un cepario.

En este contexto el control de calidad en Microbiología envuelve el monitoreo de los medios de cultivo, reactivos, instrumentos, procedimientos y el personal, para asegurar una adecuada práctica en el aislamiento, identificación y caracterización de agentes etiológicos.

El propósito del presente trabajo de seminario es elaborar un programa de control de calidad interno, que incluirá: el diseño e implantación de un control para ambientes y superficies de la campana de flujo laminar, monitoreo de ambiente interno y externo del Laboratorio Microbiológico de Referencia, el control de esterilidad del autoclave, implementar el sistema de identificación bacteriana utilizando cepas ATCC (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *S. flexneri*, *S. enteritidis*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *E. cloacae*, *L. monocytogenes*, *P. multocida*, *A. baumannii*, *K. oxytoca*, *S. typhi* y *E. faecalis*), para verificar el cumplimiento de las normas de calidad (control de medios de cultivo, control de pruebas de identificación y además muestras desconocidas al personal técnico) elaborando a la vez un manual de cepas ATCC y un manual de equipos básicos del laboratorio.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Implementar y verificar el programa de control de calidad interno para el área de microbiología del Laboratorio Microbiológico de Referencia –LAMIR-.

### B. Específicos

1. Establecer como control interno el monitoreo microbiológico de los ambientes interno y externo, del Laboratorio de Microbiología de Referencia –LAMIR-.
2. Implementar el uso de controles microbiológicos de ambiente y superficies, de la campana de flujo laminar.
3. Realizar un banco de cepas, para el Laboratorio Microbiológico de Referencia, con dos métodos de conservación.
4. Contribuir con la elaboración de un manual para el cepario del LAMIR, realizando con dichas cepas, controles a los medios de cultivo más utilizados.
5. Evaluar la capacidad de diagnóstico de los técnicos por medio de muestras desconocidas.
6. Comprobar el proceso de esterilización del autoclave, con cepas de *Geobacillus stearothermophilus*.
7. Contribuir con la elaboración de un manual de equipos básicos de laboratorio.

## **VI. HIPÓTESIS**

Por ser descriptivo este estudio no incluye hipótesis.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

Instalaciones del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-

Se realizó el monitoreo de:

- Ambiente interno y externo del LAMIR llevando a cabo 133 muestreos basados en el proyecto del FODECYT 40-2007 “Estudio Micológico del aire en áreas ocupacionales y exteriores de la Facultad de CCQQ. y Farmacia y otras áreas de la Universidad de San Carlos de Guatemala” (45). Determinando las condiciones del ambiente de laboratorio y a partir de los resultados obtenidos se harán las recomendaciones para tomar acciones correctivas.
- Superficies y ambiente de la campana de flujo laminar llevando a cabo, 38 muestreos para cada uno (superficies y ambientes), ya que era necesario verificar si el área de trabajo donde se inoculan muestras y se vierten medios de cultivo cumplen con los requisitos de esterilidad.
- Autoclave, se colocaron controles de *Geobacillus stearothermophilus*, todos los días que se llevó a cabo el proceso de esterilización, en los meses de julio y agosto, octubre y noviembre teniendo un total de 27 controles.
- Muestras desconocidas de agua: se entregaron al personal técnico de laboratorio un total de 8 muestras desconocidas, las cuales fueron analizadas y reportadas.
- Se trabajaron en aceite mineral y en congelación, 20 cepas ATCC, las cuales se utilizaron para realizar controles, en los respectivos medios de cultivo y reactivos necesarios para las pruebas bioquímicas.

## **B. Recursos**

### **1. Humanos**

- a. Estudiantes: Claudia Karina Salguero, Dina Eugenia Cuxil Vásquez
- b. Asesor: Dra. Karin Herrera

### **2. Recursos Institucionales**

- Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-

### **3. Recursos Materiales**

#### **a. Equipo**

- Campana de flujo laminar con luz UV, tipo BLS2, Marca Dalton
- Campana de flujo laminar sin luz UV, Marca Dalton
- Autoclave, Marca Sibata
- Incubadoras, Marca Sanyo
- Cámara fotográfica Marca Sony
- Cámara de Quebec Marca Reichert
- Vortex Marca Advantec
- Baño de maría Marca OKL
- Balanza semianalítica Marca Acculab
- Congelador Marca Thermo Scientific
- Refrigeradora Marca Sanyo
- Cámara de refrigeración Marca American
- Potenciómetros Marca Sibata
- Microscopios Marca Nikon
- Mecheros Marca Mercker
- Lámpara de luz UV Marca Entela, UVP
- Pipetas automáticas Marca Brand
- Termómetros Marca Total IMM
- Medios de cultivo Marca Merck
- Reactivos varios Marca Merck
- Tubos de ensayo Marca Kimax, Pyrex
- Embudos

- Varillas de agitación
- Erlenmeyers Marca Boeco y Kimax
- Beackers Marca Boeco
- Estufa eléctrica con agitador IKA-C-MAG-H57
- Probetas Marca LMS
- Pipetas Marca Silver Brand
- Balones aforados Marca Boeco
- Gradillas, sin marca
- Asas de nicromo sin marca

#### **4. Oficina**

- Computadora
- Impresora
- Hojas de papel bond
- Cartucho de tinta para impresora
- Lapiceros
- Tijeras
- Marcadores
- Masking tape

### **C. Metodología**

#### **1. Parte documental**

Se revisaron y se realizaron modificaciones, según métodos estandarizados, de las técnicas microbiológicas de ambientes y superficies para el Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, y se redactaron procedimientos operativos, de los equipos básicos utilizados en el laboratorio.

##### **a. Revisión y actualización de las técnicas microbiológicas**

Dentro del laboratorio es necesario que los procedimientos de análisis microbiológicos de superficies y ambiente sean actualizados y estén basados en procedimientos estandarizados y normalizados, ya que son necesarios para realizar de mejor forma el monitoreo de ambientes y superficies, mejorando la

calidad, productividad y competitividad, a través de la verificación e implementación de acciones correctivas cuando el caso lo amerite. Entre los que se realizaron, están los siguientes:

- Monitoreo de superficies (recuento aeróbico en placa y presencia de coliformes)
- Monitoreo de ambientes (recuento aeróbico en placa para bacterias y mohos y levaduras)

#### **b. Manual de equipos**

Se realizó un manual de equipos, en el que se especifica la siguiente información: programa general de equipos, datos generales, descripción del equipo, procedimiento de limpieza y desinfección, recomendaciones de mantenimiento preventivo; con la respectiva hoja de registro para cada uno de cada uno de los siguientes equipos:

- Campana de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadoras
- Potenciómetro
- Balanza
- Baño de María
- Sistema de refrigeración
- Microscopio
- Incinerador
- Contador de colonias
- Bomba de vacío

## **2. Parte Experimental**

Esta parte estuvo dividida en cinco fases:

- Monitoreo microbiológico de ambientes de laboratorio.
- Monitoreo microbiológico de la campana de flujo laminar:
  - Ambiente de la campana
  - Superficies de la campana
- Comprobación del proceso de esterilización del autoclave.
- Realización de un cepario de referencia con cepas ATCC.
- Muestras control de cepas ATCC.
  - Control de medios de cultivo con cepas ATCC.
  - Control de pruebas de identificación con cepas ATCC.
  - Muestras desconocidas para técnicos de laboratorio.

### **a. Monitoreo microbiológico del ambiente de laboratorio**

Este control se realizó por el método de impactación según APHA, donde se procedió a realizar el muestreo de cuatro puntos internos seleccionados del laboratorio y tres puntos externos que se describen en el diagrama del laboratorio (anexo 6, figura 3. Diseño del LAMIR). La hora de muestreo definida fue: 9:00 AM, según el proyecto de FODECYT 40-2007: “Estudio micológico del aire en áreas ocupacionales y exteriores de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y otras áreas de la Universidad de San Carlos de Guatemala” (45).

A continuación se describe la frecuencia de muestreo y el total de medios que se utilizaron para los ambientes del laboratorio:

**Tabla 1. Frecuencia y materiales para el monitoreo de ambientes de laboratorio.**

Frecuencia de muestreo	Fecha	Cantidad de muestreos	Total de cajas de PCA + Cloranfenicol	Total de cajas de Trypticasa Soya o Agar Nutritivo
Diaria	01 al 16 de julio	12	84	84
Semanal	20 de julio al 31 de agosto	7	49	49

Fuente: datos experimentales.

**i. Equipo y materiales**

- Balanza
- Cajas de petri
- Erlenmeyers
- Estufa
- Aeroscopio MAS- 100 *Eco*
- Hidrómetro
- Incubadora

**ii. Medios**

- Agar conteo en placa (PCA) suplementado con Cloranfenicol para recuento de mohos y levaduras.
- Agar Trypticasa Soya para recuento aeróbico de bacterias.
- Agua desmineralizada.

**iii. Procedimiento de toma de muestra**

- Se prepararon las cajas de petri conteniendo los medios de cultivo PCA suplementado con Cloranfenicol y Agar Trypticasa Soya.
- Para la toma de muestras de aire se uso el método volumétrico por impactación utilizando un biolector (Aeroscopio MAS 100 ECO). Con una capacidad de aire absorbido de 100 L/minuto.

- Los medios de cultivo se incubaron por 24 horas a 35.5 - 37.5 °C (Trypticase Soya) para bacterias y 5 días en el caso de mohos y levaduras a una temperatura de 24 – 28°C (PCA suplementado con Cloranfenicol).
- Se contaron las colonias desarrolladas.
- Se informan como UFC/m<sup>3</sup> (46).

#### **b. Monitoreo microbiológico en la campana de flujo laminar**

Luego de haber realizado la limpieza de la campana de flujo laminar, se enciende la luz UV, por un tiempo de 20 – 30 minutos, para terminar con el proceso de desinfección. Posteriormente se apaga la luz UV y se procede a encender ventilador del flujo laminar por un tiempo aproximado de 15 a 20 minutos antes de empezar a trabajar para que se estabilice la circulación del aire. Asegurándose de no subir del nivel indicado, la ventana frontal de vidrio. Posteriormente se realizó: el muestreo de superficies y ambiente (ver la descripción de la técnica de Recuento Aeróbico en Placa y la técnica de Recuento de Coliformes) (46).

#### **i. Muestreo de ambiente**

Se procedió a realizar el muestreo de dos puntos internos, uno del lado derecho y el otro del izquierdo de la campana de flujo laminar. A continuación se describe la frecuencia de muestreo y el total de medios que se utilizaron para los ambientes de la campana de flujo laminar:

**Tabla 2. Frecuencia y materiales utilizados en el monitoreo de ambiente de la campana de flujo laminar.**

Frecuencia de muestreo	Fecha	Cantidad de muestreos	Total de cajas de PCA + Cloranfenicol	Total de cajas de Tripticasa Soya
Diaria	01 al 16 de julio	12	24	24
Semanal	20 de julio al 31 de agosto	7	14	14

Fuente: datos experimentales.

▪ **Equipo y materiales**

- Balanza
- Cajas de Petri
- Erlenmeyers
- Estufa
- Hidrómetro
- Incubadora
- Campana de flujo laminar

▪ **Medios**

- Agar Conteo en Placa (PCA) suplementado con Cloranfenicol para recuento de mohos y levaduras.
- Agar Tripticasa Soya, para recuento aeróbico de bacterias.
- Agua desmineralizada (46).

▪ **Procedimiento de toma de muestra**

- Se prepararon las cajas de petri conteniendo los medios de cultivo PCA suplementado con Cloranfenicol y Tripticasa Soya.
- Para la toma de muestras de aire se uso el método volumétrico por impactación utilizando un biolector (Aeroscopio MAS 100 ECO). Con una capacidad de aire absorbido de 100 L/minuto.

- Se procedió a tapar e incubar por 24 horas de 35.5 - 37.5° C (Tripticasa Soya) para bacterias y 5 días a 24 - 28 °C (PCA suplementado con Cloranfenicol) en el caso de mohos y levaduras.
- En caso de crecimiento de colonias, se contaron colonias.
- Se reportó como UFC/m<sup>3</sup> (46).

## ii. Muestreo de superficies

El muestreo de la superficies de la campana se realizó en dos puntos de la misma, una del lado derecho y la otra del lado izquierdo de la mesa. A continuación se describe la frecuencia de muestreo y el total de medios que se utilizaron para las superficies de la campana de flujo laminar:

**Tabla 3. Frecuencia y materiales utilizados en el monitoreo de superficies de la campana de flujo laminar.**

Frecuencia de muestreo	Fecha	Cantidad de muestreos	Total de tubos de caldo Letheen con Tween 80	Total de cajas con PCA	Total de cajas con VRB
Diaria	01 al 16 de julio	12	24	24	24
Semanal	20 de julio al 31 de agosto	7	14	14	14

Fuente: Datos experimentales.

### ▪ Materiales

- Hisopos de madera con punta de algodón, estériles, de 15 cm de largo.
- Tubos 5 mL de caldo Letheen con Tween 80.
- Guantes estériles
- Hielera
- Gradilla
- Marcador indeleble
- Maskin tape
- Mechero
- Pipetores de 1 mL

- Cajas de petri
- Campana de flujo laminar
- **Preparación de medios e insumos**
  - Se utilizaron hisopos estériles, de madera con punta de algodón, de 15 cm de largo. Los hisopos se empacaron en un envoltorio protector para mantener la esterilidad.
  - Para las superficies en contacto con desinfectantes, se adicionó al Caldo Lethen, Tween 80 al 0.5% (desactivar fenoles).
  - Agar Conteo en Placa (PCA) para recuento aeróbico en placa.
  - Agar Bilis Rojo Violeta (VRB) para coliformes.
  - Agua desmineralizada (46).
- **Procedimiento de toma de muestra**
  - Colocarse los guantes estériles o lavarse las manos con jabón desinfectante antes de la toma de muestras.
  - Se saca el hisopo del envoltorio de forma aséptica. Se humedece el hisopo en la solución estéril y se presiona con un movimiento de rotación contra las paredes internas del tubo para retirar el exceso de solución.
  - Se sostiene el hisopo sobre la superficie a muestrear, formando un ángulo de 30 grados. Se frota el hisopo despacio y a fondo sobre una superficie aproximada de 50 cm<sup>2</sup>. Se debe repetir el mismo procedimiento en tres direcciones distintas.
  - Se humedece de nuevo el hisopo en la solución estéril rotándola contra las paredes del tubo para “desaguar el hisopo”.
  - Se introduce el hisopo en el tubo y se quiebra el mango de madera, dejando la punta de algodón dentro del tubo. Se procede a cerrar el tubo y se rotula con la identificación de la superficie, se guarda inmediatamente en la gradilla y en la hielera.
  - Las muestras deben procesarse no más de 24 horas después de la toma de muestra y mantenerse siempre refrigeradas (46).

- **Procesamiento de muestra**

Se agitan los tubos en el vortex. Se siembran en cajas porciones de 1 mL de la muestra. Se procesan según se indica en la metodologías para recuento aeróbico en placa, mohos y levaduras o recuento de coliformes. El recuento se reporta multiplicando por la dilución (1mL).

Se incubaron por 35 - 37°C para VRB por 24 horas y PCA de 24 a 48 horas. Para el PCA cuando se observó crecimiento se contaron las colonias y se calculó la cantidad de colonias recuperadas en 50 cm<sup>2</sup>. La cantidad detectada se reporta como número de UFC en 50 cm<sup>2</sup> de superficie, para el VRB se reporta como presencia/ausencia (46).

**iii. Recuento aeróbico en placa de superficies y ambientes según APHA.**

- **Materiales y reactivos**

- Incubadora a 35 - 37° C
- Mechero
- Campana
- Estufa
- Tubos de 5 mL de caldo Lethen con Tween 80
- Pipetas de 1 mL y 10 mL y puntas de pipeta.
- Contador de colonias
- Cajas de petri

- **Medios de Cultivo**

- **Ambientes**

- Agar Conteo en Placa (PCA) suplementado con Cloranfenicol (mohos y levaduras).
- Agar Tripticasa Soya o Agar Nutritivo (bacterias).

- **Superficies**

- Agar Conteo en Placa (PCA) para recuento aeróbico en placa.

**- Procedimiento**

- Se preparó el medio PCA, ajustando el pH a 6.8-7.2.
- Se agregó 1 mL de la muestra de los tubos con Caldo Letheen.
- Se vertieron 15 mL de PCA enfriado a 44 - 46° C en las cajas de petri, mezclando y dejando solidificar.
- Se invirtieron las cajas solidificadas y se incubaron por 24 - 48 horas a 35 a 37° C.
- Se dejó un control negativo por cada corrida.
- Se evaluaron las placas y se contaron las colonias (46).

**iv. Recuento de coliformes según APHA****▪ Materiales y reactivos**

- Incubadora a 35.5 -37.5° C
- Mechero
- Campana
- Estufa
- Tubos de 5 mL de caldo Letheen con Tween 80
- Pipetas de 1 mL
- Contador de colonias
- Cajas de petri

**▪ Medios de Cultivo****- Superficies**

- Agar Bilis Rojo Violeta (VRB) para recuento de coliformes.

**▪ Procedimiento**

- Se transfirió 1 mL de la muestra de tubos de caldo Letheen con Tween 80 a cajas de petri.

- Se vertieron 15 mL de Bilis Rojo Violeta (VRB enfriado a 44-46°C en las cajas de petri).
- Se mezcló, se dejó solidificar y se invirtieron las cajas solidificadas.
- Se incubó 24+/- 2 horas a 35 - 37°C.
- Siempre se debe dejó un control por cada corrida.
- Las placas con crecimiento se evaluaron con ayuda de un contador de colonias
- Se contaron colonias. Contando como presuntivas, solamente las colonias lactosa positivo. Estas son de color corinto con una zona de precipitación roja.
- Se reportaron únicamente como presencia/ausencia (46).

**c. Comprobación del proceso de esterilización del autoclave**

▪ **Procedimiento del control de esterilidad**

- Se identifica el indicador biológico anotando en la etiqueta del indicador, la fecha de procesamiento (56).
- Se coloca un indicador biológico con el tapón hacia arriba en un frasco de vidrio.
- Se coloca el frasco con la ampolla, en una carga completa en el área más difícil de penetrar por el agente esterilizante. Se procede a cargar como de costumbre.
- Se retira el indicador biológico del esterilizador y se deja enfriar durante al menos 10 minutos antes de romperlo.
- Se comprueba el cambio de color rosa a marrón del indicador químico que está en la etiqueta del indicador biológico, confirmando que el indicador biológico fue expuesto al proceso de esterilización al vapor. Este cambio de color no indica que el proceso fue suficiente para conseguir la esterilidad.
- Se procede a romper e incubar el indicador biológico a  $56 \pm 2$  °C ( $133 \pm 3$ °F), para activar el indicador.

- Se debe incubar mensualmente un indicador biológico, sin procesar (control positivo). Verificando que el indicador del control positivo tenga la misma fecha de fabricación y el mismo número de lote que el indicador procesado que se encuentra en la incubadora.
- Se identifica escribiendo una C y la fecha en la etiqueta del indicador para el control positivo. Se activa e incuba a  $56 \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $133 \pm 3^{\circ}\text{F}$ ). El objetivo del control positivo consiste en garantizar:
  - Que se cumple con las condiciones correctas de incubación.
  - La viabilidad de los indicadores (las condiciones incorrectas de almacenamiento podrían afectar negativamente a los indicadores que aun están dentro de su periodo de validez).
  - La capacidad del medio de cultivo para promover un crecimiento rápido.
- Se incuba el indicador biológico procesado y el indicador usado como control durante 48 horas a  $\pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $133 \pm 3^{\circ}\text{F}$ ) (47).

- **Tiempos de Incubación**

- Detección temprana: se realizaron a los siguientes tiempos de incubación a las 12 horas 18 horas, 24 horas.
- Lectura final se realizó a las 48 horas.

- **Interpretación de resultados**

- Un color amarillo en el indicador procesado, demuestra crecimiento bacteriano y por lo tanto, un fallo en el proceso de esterilización. Si no hay cambio de color, el proceso de esterilización fue adecuado. El resultado final negativo se hace después de 48 horas de incubación. El indicador usado como control positivo debe mostrar un cambio de color amarillo para que los resultados del indicador procesado sean validos.
- Se registran los resultados del indicador biológico procesado y del control. Siempre se debe probar el esterilizador y no utilizarlo hasta que el resultado del indicador biológico sea negativo (47).

**d. Realización de un cepario de referencia con cepas ATCC**

Se trabajó a través de dos metodologías para preservar viables las cepas ATCC y puedan ser utilizadas como material de referencia para evaluar el control de calidad, dentro de los procedimientos del laboratorio, estas fueron:

- Conservación en aceite mineral.
- Conservación con glicerol de cepas ATCC por congelación (37-39).

**i. Conservación de cepas ATCC en aceite mineral****▪ Equipo y materiales**

- Balanza
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.
- Erlenmeyers
- Estufa
- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Pipetas pasteur
- Pipetas 1 y 2 mL

**▪ Medios**

- Agar Tripticasa soya o Agar nutritivo.
- Aceite mineral.
- Cepas ATCC

**▪ Procedimiento**

- En tubos con tapón con rosca de 13 x 100 mm, se agregaron 5 mL del medio de cultivo (Importante: El slant a 2 cm del tapón del tubo de cultivo).
- Se inoculó la cepa en 2 tubos en slant por cada cepa a conservar en Agar Tripticasa Soya.
- Se incubaron los tubos por 24 horas a 35 - 37°C.
- Se observó el crecimiento y pureza de las cepas.
- Realizando pruebas de identificación de cepas: Gram, Oxidasa e Indol.

- Se descartaron los tubos que presentaban algún tipo de contaminación y se rotuló el resto de tubos con los códigos y nombres de las cepas a conservar.
- Se agregó el aceite mineral estéril resbalado por las paredes del tubo de ensayo utilizando micropipetas Pasteur previamente esterilizadas (este proceso se realizó dentro de la campana de flujo laminar), el aceite mineral cubrió totalmente el slant del tubo de cultivo.
- Se colocaron las cepas conservadas en el lugar seleccionado para guardar el cepario de referencia (37-39).

## ii. Conservación en glicerol de cepas ATCC por congelación

### ▪ **Equipo y materiales**

- Balanza
- Tubos con rosca de 13 x 100 mm.
- Erlenmeyers
- Estufa
- Congelador
- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Tubos con rosca de 15 a 45 mm
- Pipetas pasteur
- Pipetas 1 y 2 mL

### ▪ **Medios**

- Cepas ATCC
- Caldo de Tripticasa Soya
- Caldo de Tripticasa Soya con glicerol al 30%.

### ▪ **Procedimiento**

- Se colocó el inóculo de la cepa en 1 mL de caldo de Tripticasa Soya.
- Se incubaron por 24 horas a una temperatura de 35 - 37°C.

- Se observó crecimiento de la cepa (turbidez), realizando las pruebas de identificación de cepa: Gram, Oxidasa e Indol.
- Se descartaron los tubos que presentaron algún tipo de contaminación y se rotuló el resto de tubos con los códigos y nombres de las cepas a conservar.
- Se le agregó 1 mL de caldo de Tripticasa Soya con glicerol al 30%.
- Se colocó 1 mL del caldo con la cepa en tubos (10 muestras por cepa).
- Se rotuló cada uno de los tubos con los códigos y nombres de las cepas a conservar.
- Se almacenaron en congelación de -50 a -70°C (38,39).

**Nota:** cuando sea necesario utilizar cepas, estas se deben descongelar y posteriormente se deben descartar ya que no pueden ser reutilizadas.

#### **e. Muestras control con cepas ATCC**

Las cepas ATCC son de referencia certificada, y se necesitan para la verificación de la calidad, de los medios de cultivo y reactivos, así como para la evaluación de métodos microbiológicos, las que son necesarias para el control interno de calidad, en este estudio se realizaran tres tipos de control:

- Control de medios de cultivo con cepas ATCC.
- Control de pruebas de identificación con cepas ATCC.
- Muestras desconocidas para técnicos de laboratorio.

#### **i. Control de medios de cultivo con cepas ATCC**

El control de calidad de los medios de cultivo, se controló con cepas de referencia. Esto se realizó por cada medio como se describe en la tabla 4. Utilizando Cepas ATCC como controles positivo y negativo (20).

- **Materiales**

- Cepas ATCC
- Asas de nicromo
- Medios de cultivo a evaluar
- Autoclave
- Estufa
- Balanza
- Agua desmineralizada
- Agua peptonada estéril

- **Procedimiento**

- Se tomó con el asa, del microorganismo evaluado (cepas ATCC).
- Se colocó una asada de la cepa a verificar, en tubos con 10 mL de agua peptonada estéril.
- Se inoculó por estriado o vertido según la composición del medio (sólido o líquido)
- Todos los medios que se prepararon, fueron evaluados con controles positivo y negativo (18).
- En la tabla 4. Se detallan las cepas utilizadas en cada caso.

**Tabla 4. Cepas ATCC utilizadas como controles positivo y negativo de los medios de cultivo**

Medio	Control positivo	Control negativo
Caldo Lauril Sulfato	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Caldo E.C.	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Agua Peptonada	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Urea	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>
PCA con Cloranfenicol	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Baird Parker	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Bilis rojo violeta (VRB)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Agar MacConkey	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
Fluorocult®	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella flexneri</i>
Chromocult®	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>

Fuente: Microbiology. Manual MERCK® 2000 (20).

## ii. Control de pruebas de identificación con cepas ATCC

El control de los reactivos, se realizó por medio de las pruebas de identificación: Gram, Oxidasa, LIA, MIO, TSI, Rojo de Metilo, Vogues Proskauer e Indol, verificando con cepas ATCC para controles positivo y negativo (26). Esto se realizó para cada una de las pruebas que se describen en la Tabla 5. Control positivo y negativo para pruebas de identificación (20).

### ▪ Materiales

- Cepas ATCC
- Asas
- Reactivos específicos según técnica a evaluar
- Pinzas

- Agua desmineralizada
  - Agua peptonada estéril
- **Procedimiento**
  - Se tomó con el asa, del microorganismo evaluado (cepas ATCC).
  - Se colocó una asada de la cepa a verificar, en tubos con 10 mL de agua peptonada estéril.
  - Se siguió la técnica específica para cada una de las pruebas a realizar.
  - Para las pruebas de identificación, se colocaron controles positivo y negativo, con los reactivos utilizados. En la Tabla 5. Se detallan las cepas ATCC a utilizadas en cada caso (26).

**Tabla 5. Control positivo y negativo para pruebas de identificación.**

<b>Prueba de identificación</b>	<b>Control positivo</b>	<b>Control negativo</b>
Gram	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Oxidasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>
Indol	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella typhimurium</i>
Rojo de metilo	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Voges Proskauer	<i>Enterobacter cloacae</i> o <i>Serratia marcescens</i>	<i>Escherichia coli</i>
TSI	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
LIA	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MIO	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>

Fuente: Microbiology. Manual MERCK® 2000 (20).

### **iii. Muestras desconocidas**

Las muestras de agua se codificaron como muestras normales, para evitar un tratamiento especial. Fueron preparadas con microorganismos ATCC suspendidos en agua peptonada. Se inoculó una asada del cultivo fresco de la cepas ATCC a evaluar en 10 mL de agua peptonada. Se entregó al personal del laboratorio para su procesamiento. Los duplicados fueron realizados por el supervisor del laboratorio (15).

#### **▪ Procesamiento**

Las muestras fueron procesadas siguiendo los procedimientos establecidos en cada metodología, con las mismas condiciones de trabajo (temperatura, humedad, equipo, entre otros) (15).

#### **▪ Frecuencia**

La frecuencia de realización de las pruebas fue en forma quincenal, llevándose a cabo ocho verificaciones por parte del técnico de laboratorio.

#### **▪ Ingreso y reporte de resultados**

El reporte de resultados entregado por el personal técnico del laboratorio fue ingresado en el formato correspondiente de resultados.

## **D. Diseño de la investigación**

El presente estudio es de tipo descriptivo

### **1. Muestra y diseño de muestreo**

Se realizaron por conveniencia:

Diecinueve muestreos de ambiente y superficies de la campana de flujo laminar luego de haberse realizado el procedimiento de limpieza, desinfección y tratamiento con luz UV.

Setenta y seis muestreos de ambientes de cuatro puntos internos del Laboratorio de Microbiología de Referencia –LAMIR- realizados en el periodo de junio a agosto de 2010.

Cincuenta y siete muestreos de ambientes de tres puntos externos específicos del Laboratorio de Microbiología de Referencia –LAMIR- realizados en el periodo de junio a agosto de 2010.

### **2. Análisis Estadístico**

Para analizar los datos, se utilizó estadística descriptiva.

Según los esquemas de muestreo y los resultados obtenidos se realizaron acciones correctivas para llegar a un parámetro aceptable para el laboratorio.

## VIII. RESULTADOS

Para la implementación y verificación del sistema de control interno del área de microbiología del -LAMIR-, según necesidades observadas, se determinaron cinco aspectos específicos, el monitoreo de ambiente interno y externo del LAMIR, el monitoreo de las superficies y ambiente de la campana de flujo laminar, el control del proceso de esterilización del autoclave, muestras desconocidas para el personal técnico y la realización de un cepario, los cuales son importantes y deben ser cumplidos por los laboratorios de ensayo que deseen acreditarse por la Oficina Guatemalteca de Acreditación -OGA-, la cual está basada en la norma COGUANOR NTG/ISO/IEC17025. Los resultados son los que se describen a continuación.

Para el monitoreo de ambiente interno se determinaron cuatro puntos del laboratorio, basados en la afluencia del personal, el flujo de aire externo el cual puede afectar los resultados de los análisis realizados, estos fueron el punto 1, el área ubicada al lado de la ventana que comunica con el exterior del laboratorio y a un costado de la campana de flujo laminar, el punto 2 ubicado en el lado derecho de la mesa de trabajo, el punto 3 ubicado en la mesa de la entrada al laboratorio y el punto 4 ubicado en el lado izquierdo de la mesa de trabajo. La hora de muestreo definida fue basada en el proyecto de FODECYT 40-2007 (45).

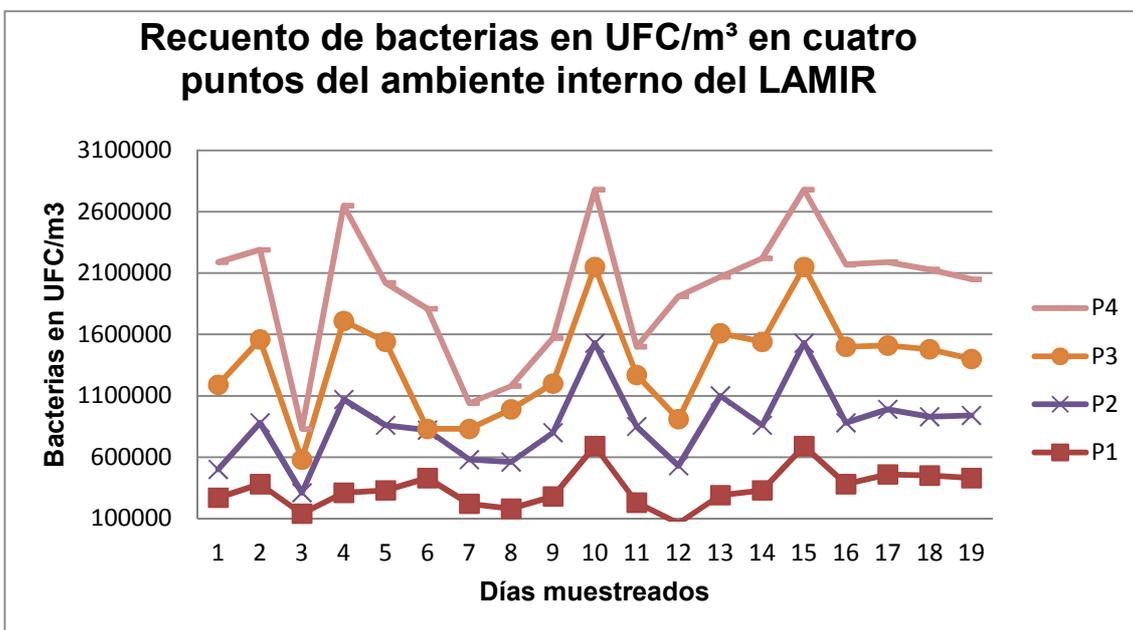
En la tabla 6 y gráfica 1 se presentan los resultados obtenidos de los muestreos realizados en los puntos internos del -LAMIR-, en donde la carga bacteriana es expresada en unidades formadoras de colonia por metro cúbico ( $\text{UFC}/\text{m}^3$ ), determinando que para el punto 1, prevaleció una menor carga bacteriana con un valor mínimo de  $150,000 \text{ UFC}/\text{m}^3$ , el que presenta menor contaminación. En comparación de los conteos altos detectados  $1,000,000 \text{ UFC}/\text{m}^3$  que corresponden al punto 4, estos recuentos elevados pueden estar asociados a varios factores como: el área de más tránsito de personas, además en este punto se realizan las lecturas de tubos y cajas de las muestras que refieren al laboratorio y a la vez en esta área se encuentra el descarte de los materiales utilizados en el laboratorio.

**Tabla 6. Recuento de bacterias del ambiente, de cuatro puntos internos del -LAMIR-.**

<b>Muestreo No.</b>	<b>P1(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P2(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P3(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P4(UFC/m<sup>3</sup>)</b>
1	270000	230000	690000	1000000
2	380000	500000	680000	730000
3	140000	170000	270000	250000
4	310000	760000	640000	940000
5	330000	530000	680000	480000
6	430000	390000	10000	980000
7	220000	360000	250000	210000
8	180000	380000	430000	190000
9	280000	520000	400000	370000
10	690000	840000	620000	630000
11	230000	620000	420000	230000
12	60000	470000	380000	1000000
13	290000	810000	510000	460000
14	330000	530000	680000	680000
15	690000	840000	620000	630000
16	380000	500000	620000	670000
17	460000	530000	520000	680000
18	450000	480000	550000	650000
19	430000	510000	460000	650000

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 1. Recuento de bacterias del ambiente interno del laboratorio de referencia.**



Fuente: datos experimentales

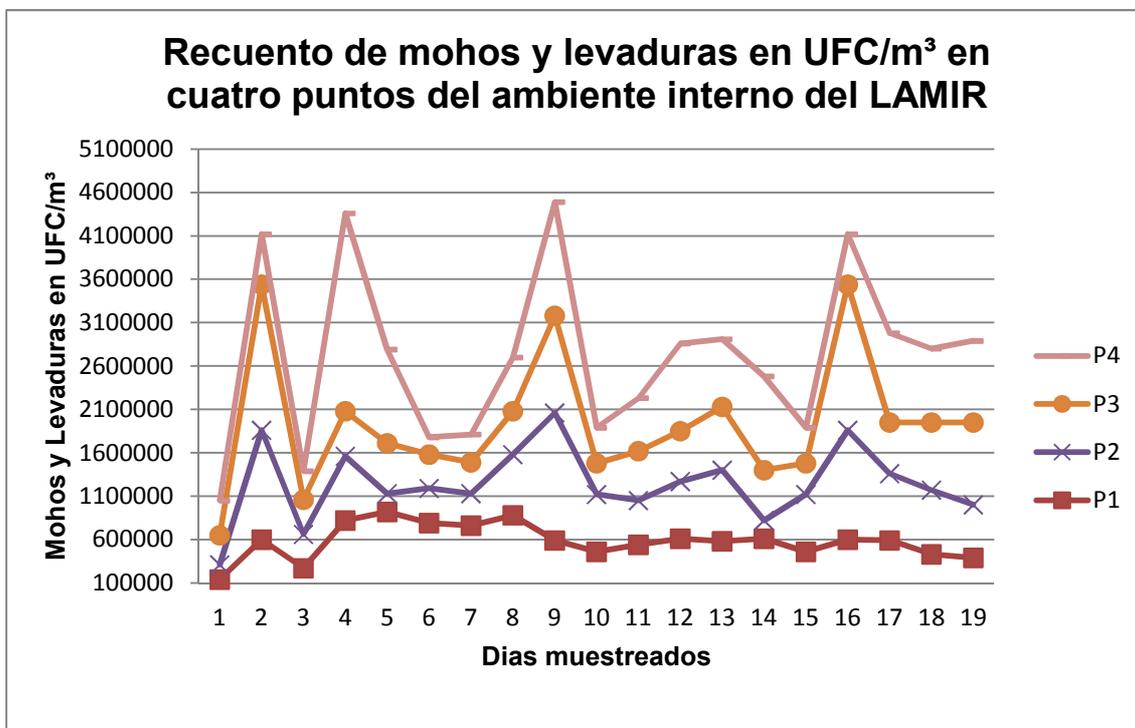
En la tabla 7 y gráfica 2 se presenta la carga fúngica expresada en unidades formadoras de colonia por metro cúbico (UFC/m<sup>3</sup>), al igual que las bacterias. La menor presencia de mohos y levaduras está en el punto 1 donde la carga fúngica mínima detectada fue de 120,000 UFC/m<sup>3</sup>. En los puntos 3 y 4, se presentaron las cargas más altas de mohos y levaduras con una lectura máxima de 2,300,000 UFC/m<sup>3</sup>.

**Tabla 7. Recuento de mohos y levaduras del ambiente, de cuatro puntos internos del -LAMIR-.**

<b>Muestreo No.</b>	<b>P1(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P2(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P3(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P4(UFC/m<sup>3</sup>)</b>
1	140000	170000	340000	400000
2	600000	1260000	1680000	580000
3	270000	390000	400000	330000
4	820000	740000	520000	2280000
5	920000	210000	580000	1080000
6	790000	400000	390000	200000
7	760000	370000	360000	320000
8	880000	700000	500000	620000
9	590000	1470000	1120000	1310000
10	460000	660000	360000	410000
11	540000	510000	570000	610000
12	610000	660000	580000	1010000
13	580000	820000	730000	780000
14	610000	210000	580000	1080000
15	460000	660000	360000	410000
16	600000	1260000	1680000	580000
17	590000	770000	590000	1030000
18	430000	740000	780000	850000
19	390000	610000	950000	940000

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 2. Recuento de mohos y levaduras del ambiente interno del laboratorio de referencia.**



Fuente: datos experimentales

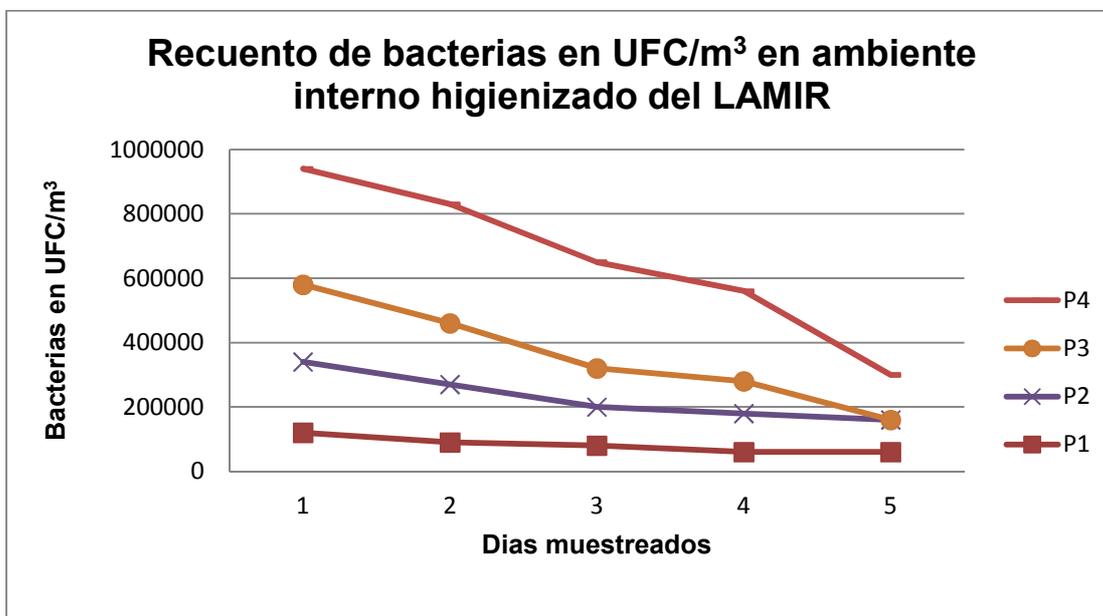
Por los resultados anteriormente descritos de recuentos microbianos altos, se llevaron a cabo aplicaciones por aspersion de químicos (amonio cuaternario, acido peracético), disminuyendo los conteos microbiológicos. De esta forma se mejoro el ambiente interno para los análisis que se realizan y la salud del personal. En la tabla 8 y gráfica 3 se presenta el descenso del recuento de bacterias dentro del laboratorio, con un valor de 60,000 UFC/m<sup>3</sup>, en comparación a los recuentos reportados en la tabla 6 y gráfica 1 donde el valor mínimo fue de 150,000 UFC/m<sup>3</sup>.

**Tabla 8. Recuento de bacterias del ambiente interno higienizado, de cuatro puntos internos del -LAMIR-.**

Muestreo No.	P1(UFC/m <sup>3</sup> )	P2(UFC/m <sup>3</sup> )	P3(UFC/m <sup>3</sup> )	P4(UFC/m <sup>3</sup> )
1	120000	220000	240000	360000
2	90000	180000	190000	370000
3	80000	120000	120000	330000
4	60000	120000	100000	280000
5	60000	100000	0	140000

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 3. Recuento de bacterias en UFC/m<sup>3</sup> en ambiente interno higienizado del LAMIR.**



Fuente: datos experimentales

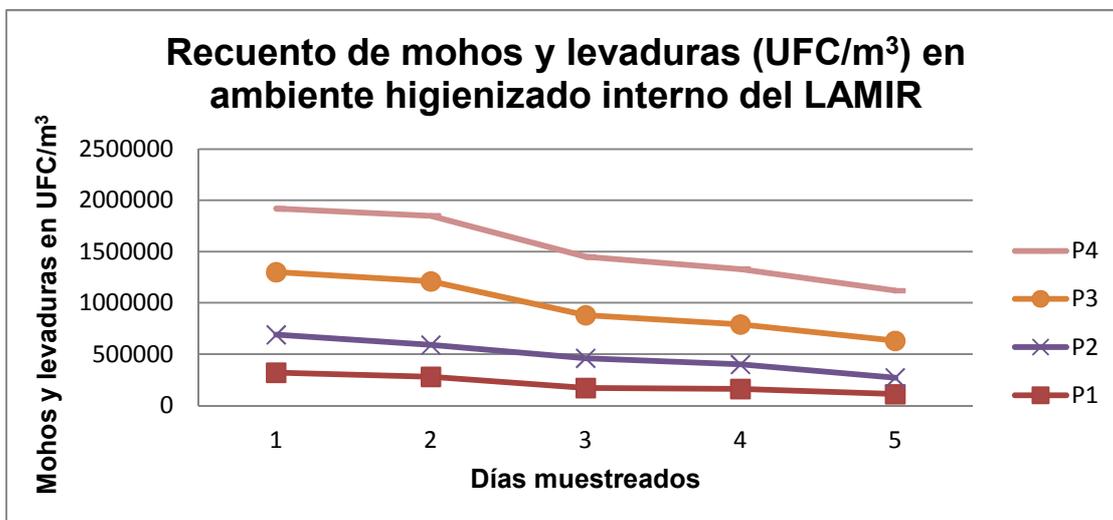
En la tabla 9 y gráfica 4 se presenta la misma tendencia de la gráfica 3. Se observó un descenso en el recuento de mohos y levaduras, ya que de un recuento de 2, 300,000 UFC/m<sup>3</sup> (punto 4; gráfica 2), disminuyó a 640,000 UFC/m<sup>3</sup>, en el cual se reportó mayor contaminación. Con relación al conteo mínimo reportado, que fue de 120,000 UFC/m<sup>3</sup> (punto 1; gráfica 2) disminuyó a 110,000 UFC/m<sup>3</sup>, se considera que el cambio registrado se debió al mismo tratamiento realizado con químicos descrito anteriormente en el recuento de bacterias.

**Tabla 9. Recuento de mohos y levaduras del ambiente interno higienizado, de cuatro puntos internos del -LAMIR-.**

Muestreo No.	P1(UFC/m <sup>3</sup> )	P2(UFC/m <sup>3</sup> )	P3(UFC/m <sup>3</sup> )	P4(UFC/m <sup>3</sup> )
1	320000	370000	610000	620000
2	280000	310000	620000	640000
3	170000	290000	420000	570000
4	160000	240000	390000	540000
5	110000	160000	360000	490000

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 4. Recuento de mohos y levaduras en UFC/m<sup>3</sup> en ambiente higienizado del LAMIR.**



Fuente: datos experimentales

Para los ambientes externos se asignaron tres puntos de control los cuales fueron los puntos 1 y 2 los que corresponden a los laboratorios escuela del área de microbiología. El punto 3 que corresponde al área frente al laboratorio, donde se encuentra ubicado el sistema de refrigeración de los laboratorios de microbiología. Estos puntos fueron seleccionados para determinar la carga microbiológica la cual puede influir indirectamente al área interna del laboratorio (anexo 6, figura 3. Diseño del LAMIR).

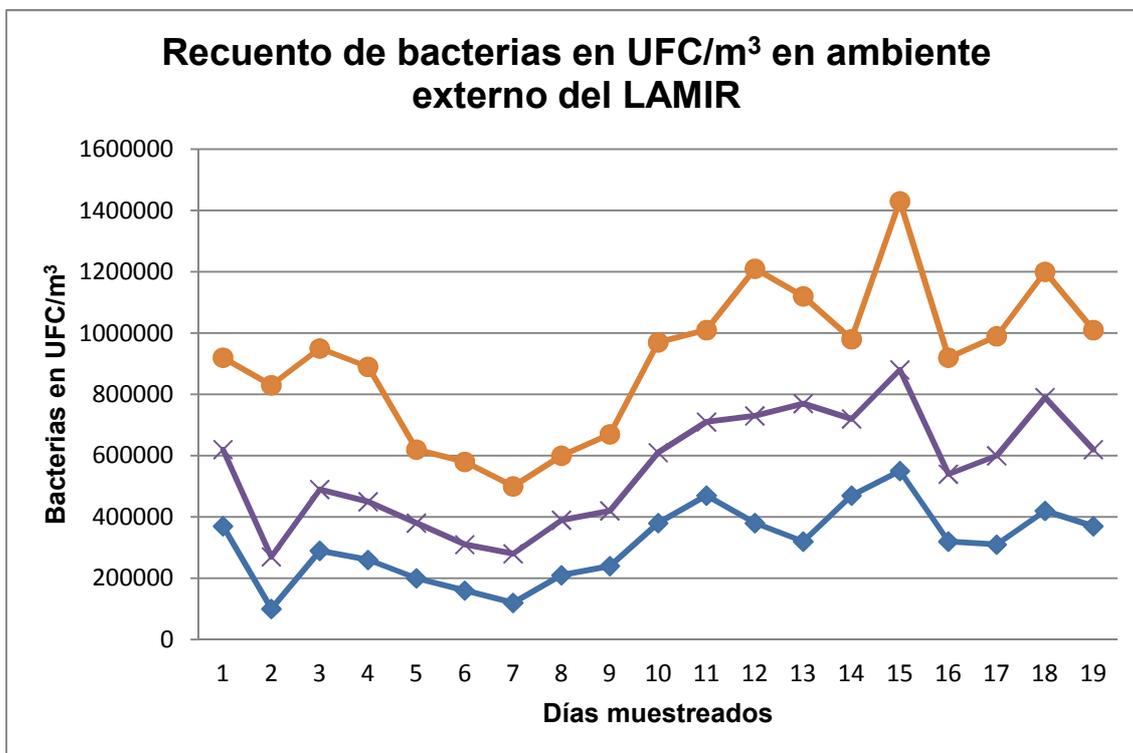
En la tabla 10 y gráfica 5 se presentan los resultados obtenidos de tres puntos de muestreo en los cuales el punto 2 es el que presenta menores conteos bacterianos con un recuento mínimo 150,000 UFC/m<sup>3</sup>. El punto 3 es el que presenta mayor contaminación bacteriana, con un recuento mínimo de 210,000 UFC/m<sup>3</sup>.

**Tabla 10. Recuento de bacterias del ambiente de tres puntos externos del -LAMIR-.**

<b>Muestreo No.</b>	<b>P1(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P2(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P3(UFC/m<sup>3</sup>)</b>
1	370000	250000	300000
2	100000	170000	560000
3	290000	200000	460000
4	260000	190000	440000
5	200000	180000	240000
6	160000	150000	270000
7	120000	160000	220000
8	210000	180000	210000
9	240000	180000	250000
10	380000	230000	360000
11	470000	240000	300000
12	380000	350000	480000
13	320000	450000	350000
14	470000	250000	260000
15	550000	330000	550000
16	320000	220000	380000
17	310000	290000	390000
18	420000	370000	410000
19	370000	250000	390000

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 5. Recuento de bacterias aisladas del ambiente externo del LAMIR.**



Fuente: datos experimentales

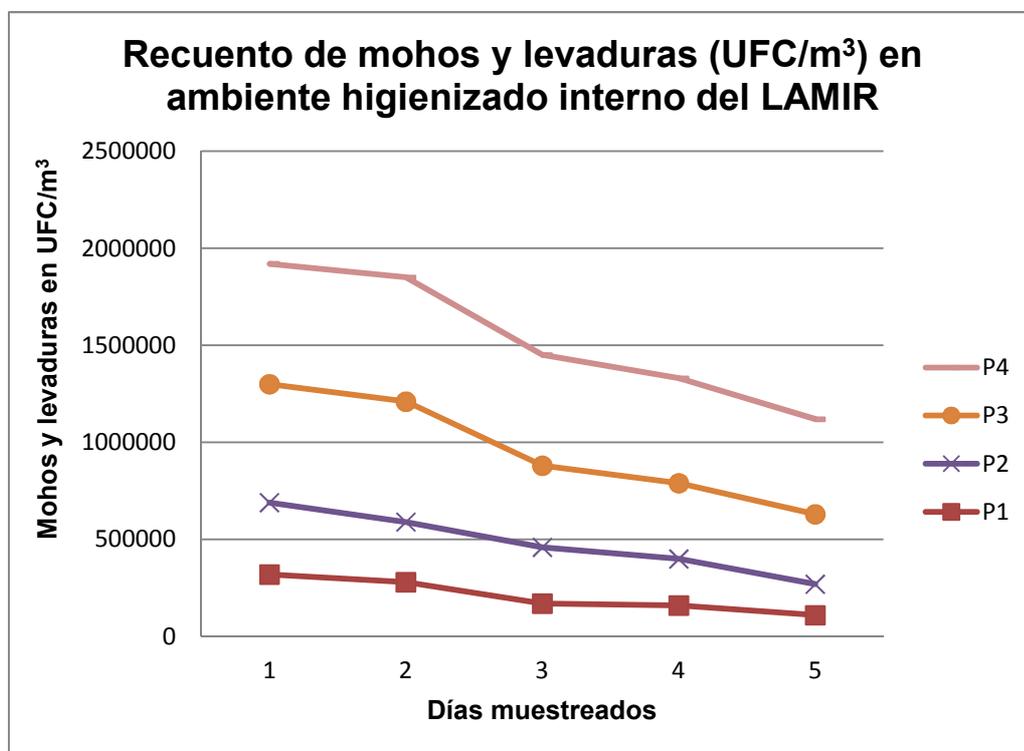
En el ambiente externo, se muestrearon tres puntos y los resultados del recuento para mohos y levaduras se presentan en la tabla 11 y gráfica 6. En los cuales el punto 2 es el que presenta menores conteos fúngicos con un recuento mínimo 300,000 UFC/m<sup>3</sup>, y el punto 3 es el que presenta mayor contaminación fúngica, con un recuento mínimo de 380,000 UFC/m<sup>3</sup>.

**Tabla 11. Recuento de mohos y levaduras del ambiente de tres puntos externos del -LAMIR-.**

<b>No. Muestras</b>	<b>P1(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P2(UFC/m<sup>3</sup>)</b>	<b>P3(UFC/m<sup>3</sup>)</b>
1	1000000	880000	880000
2	1170000	1420000	1800000
3	370000	320000	1440000
4	970000	530000	570000
5	780000	400000	620000
6	270000	370000	530000
7	570000	410000	610000
8	680000	710000	760000
9	750000	1060000	1570000
10	420000	510000	510000
11	910000	960000	860000
12	560000	570000	460000
13	480000	630000	680000
14	460000	880000	880000
15	440000	630000	700000
16	510000	410000	720000
17	360000	470000	750000
18	480000	560000	810000
19	610000	430000	380000

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 6. Recuento de mohos y levaduras aislados del ambiente externo del LAMIR.**



Fuente: datos experimentales

Para la verificación del proceso de limpieza y desinfección de la campana de flujo laminar, se llevaron a cabo monitoreos de ambientes, obteniendo, un resultado satisfactorio con 100% de esterilidad, ya que en los diecinueve muestreos realizados, no se observó crecimiento bacteriano ni fúngico. En la tabla 12 se presentan las frecuencias absolutas y los resultados de los muestreos.

**Tabla 12. Frecuencias absolutas y los resultados obtenidos en el monitoreo de los ambientes de la campana de flujo de laminar**

Monitoreo	No. de muestras	Resultado
Recuento de bacterias UFC/m <sup>3</sup>	19	0
Recuento de mohos y levaduras UFC/m <sup>3</sup>	19	0

Fuente: datos experimentales

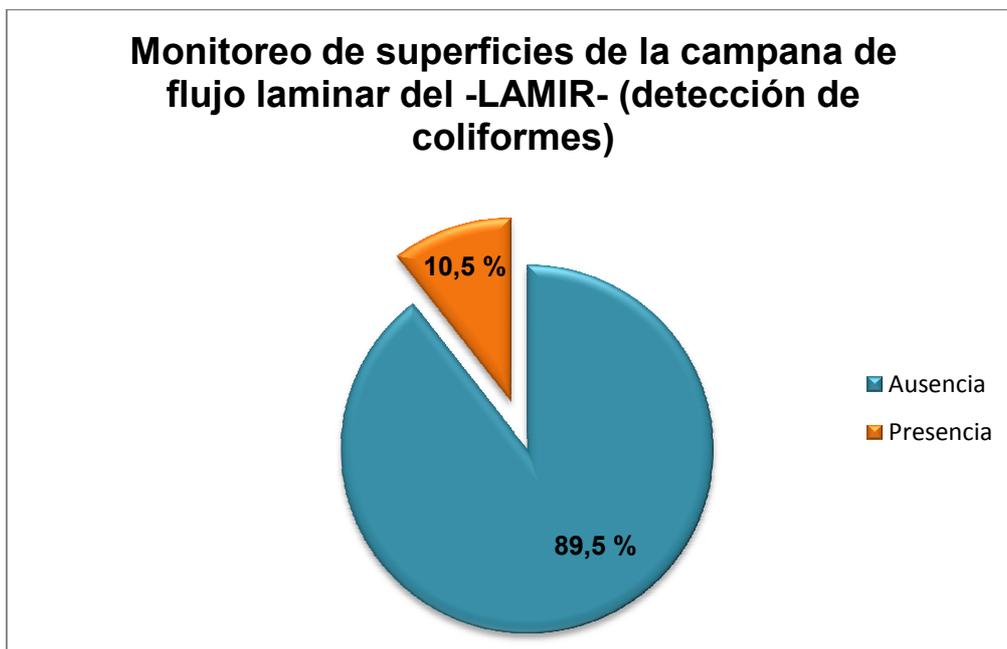
También se realizaron muestreos de superficies de dos puntos de la mesa de trabajo de la campana de flujo laminar, después de realizado el proceso de limpieza y desinfección. De los diecinueve muestreos realizados se obtuvo el 89.5% de efectividad (tabla 13), un detalle muy importante que hay que tomar en cuenta, ya que en esta área es donde se procesan las muestras que se refieren al laboratorio, y un 10.5% que corresponde a un muestreo en el que se detectó presencia de coliformes (gráfica 7).

**Tabla 13. Frecuencias absolutas y porcentaje de los resultados obtenidos en el monitoreo de la superficie de la campana de flujo de laminar**

Detección	No. de muestras	%
Ausencia	18	89,5
Presencia	1	10,5
TOTAL	19	100

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 7. Monitoreo de la superficie de la campana de flujo laminar del LAMIR.**



Fuente: datos experimentales

Se comprobó el proceso de esterilización del autoclave, cada vez que se utilizó, con indicadores biológicos de lectura rápida Attest, que contienen una población estandarizada viable de esporas de *Geobacillus stearothermophilus*, para la evaluación se utilizaron dos tipos de ampolla, la primera es la Attest Rapid 1292, con un tiempo de incubación y lectura de tres horas y la segunda es la Attest Rapid 1262 con un tiempo de lectura preliminar de 24 horas y confirmatorio de 48 horas, por un tiempo de cinco meses (mayo, junio, julio, octubre y noviembre).

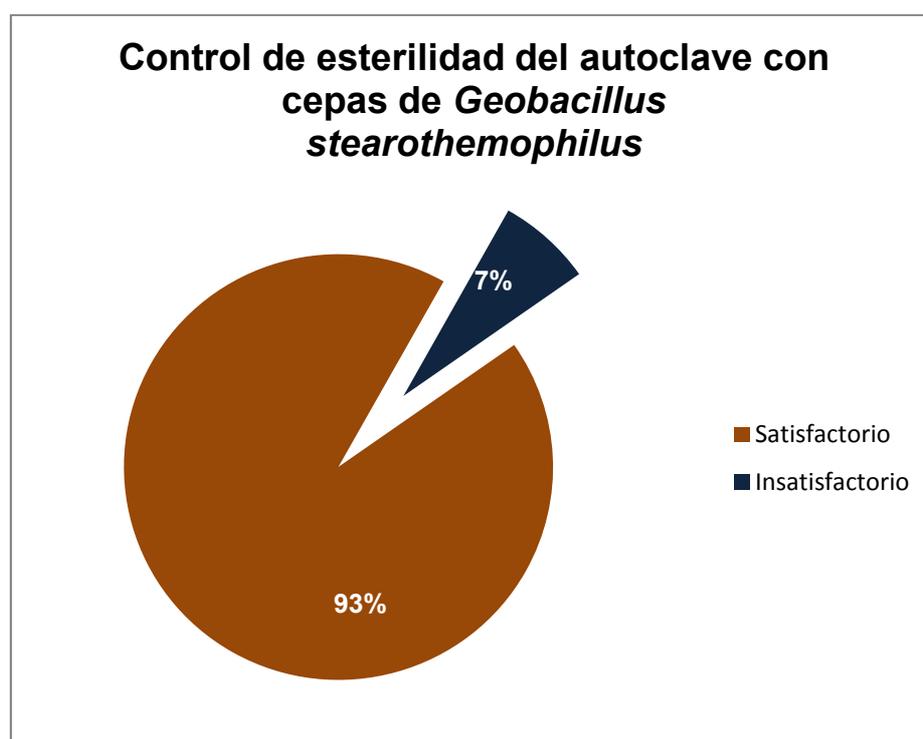
De los veintisiete controles realizados se obtuvo un 93% de efectividad, y un 7.14% de procesos que no se llevaron a cabo correctamente, lo datos se presentan en la tabla 14, grafica 8.

**Tabla 14. Frecuencias absolutas y porcentajes de los resultados obtenidos del control de esterilidad del autoclave con cepas de *Geobacillus stearothermophilus* 3M<sup>®</sup>.**

Resultado	No. de controles	%
Satisfactorio	25	92.86
Insatisfactorio	2	7.14
TOTAL	27	100

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 8. Comprobación del proceso de esterilización del autoclave del LAMIR.**



Fuente: datos experimentales

Para la conservación de cepas ATCC se utilizaron dos metodologías (Aceite Mineral y Caldo Tripticasa Soya con Glicerol al 30%) las que están descritas en la tabla 15.

**Tabla 15. Listado de cepas ATCC para el cepario del -LAMIR-.**

No.	CEPA	ATCC
1	<i>Escherichia coli</i>	25922
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
4	<i>Proteus vulgaris</i>	13315
5	<i>Proteus mirabilis</i>	14153
6	<i>Serratia marcescens</i>	5084
7	<i>Enterobacter cloacae</i>	23353
8	<i>Bacillus subtilis</i>	6633
9	<i>Bacillus cereus</i>	10876
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603
11	<i>Salmonella typhimurium</i>	13311
12	<i>Salmonella enteritidis</i>	14028
13	<i>Shigella flexneri</i>	9199
14	<i>Cándida albicans</i>	60193
15	<i>Listeria monocytogenes</i>	10115
16	<i>Pasteurella multocida</i>	12947
17	<i>Acinetobacter baumannii</i>	17978
18	<i>Klebsiella oxytoca</i>	49131
19	<i>Salmonella typhi</i>	6539
20	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212

Fuente: datos experimentales

Se realizaron pruebas a 20 cepas ATCC en diferentes medios de cultivo y sus respectivas pruebas bioquímicas (tabla 16) y a la vez se redactó un Manual de Cepas para el LAMIR.

**Tabla 16. Pruebas bioquímicas y de medios de cultivo con cepas ATCC del cepario del -LAMIR-.**

<b>01. <i>E. coli</i> 25922</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Voges Proskauer	Negativo
Rojo de Metilo	Positivo
Indol	Positivo
Oxidasa	Positivo
Catalasa	Positivo
Citrato	Negativo
TSI	Acido/Acido, Gas (+)
LIA	Alcalino/neutro
Ureasa	Negativo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar MacConkey	Colonia de color rosada a roja, lactosa positivo
Agar Sangre	colonias producen beta hemolisis
Agar EMB	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
Caldo Fluorocult-LMX®	Fluorescencia-Indol (positivo)
Agar Trypticase Soya	Colonia grande y blanca
Agar Chromocult®	Colonias azul oscuro a moradas grandes
<b>02. <i>Staphylococcus aureus</i> 25923</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Positivo
Coagulasa	Positivo
Oxidasa	Negativo
Catalasa	Positivo
Ornitina descarboxilasa	No descarboxila
Movilidad	Negativo

Indol	Negativo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Trypticase Soya	Colonias de color blanco
Agar Sabouraud	Colonias blancas, secas, pequeñas
Agar Baird Parker	Colonia redondas, de bordes lisos, húmedas, brillantes, negras, con un borde blanco fino, rodeadas de un halo claro.
Agar Manitol Bal	Colonias amarillas
Agar Sangre	Colonias blancas con hemólisis
<b>03. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Coagulasa	Positivo
Manitol	Positivo
Oxidasa	Positivo
Catalasa	Positivo
Rojo de Metilo	Negativo
Voges Proskauer	Negativo
Indol	Negativo
TSI	Alcalino/Alcalino
MIO	Movilidad positiva, no descarboxila la ornitina ni la lisina.
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Trypticase Soya	Colonia de color blanca grande, con pigmento verde.
Agar Sangre	Colonias blancas mucosas y grandes, que producen beta-hemólisis.
Agar MacConkey	Colonias lactosa negativo, con pigmento verdoso.
Agar Cetrimida	Colonias con pigmentación verde con fluorescencia

<b>04. <i>Proteus vulgaris</i> 13315</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Manitol	Negativo
Rojo de Metilo	Positivo
Voges Proskauer	Negativo
Movilidad	Positivo
Hidrólisis de la gelatina	Positivo
Urea	Positivo
Indol	Positivo
Oxidasa	Negativo
Catalasa	Positivo
TSI	Alcalino/acido
H <sub>2</sub> S	Positivo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar MacConkey	Colonias transparentes e incoloras
Agar Salmonella-Shigella	Colonias incoloras con centro negro
Agar EMB	Colonias transparentes con bordes vellosos
Agar Sangre	Crecimiento en terrazas de color cremoso con "swarming"
Agar Tripticasa Soya	Colonia incolora.
Agar Chocolate	Crecimiento en terrazas de color cremoso con "swarming"
<b>05. <i>Proteus mirabilis</i> 14153</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
H <sub>2</sub> S	Positivo
Indol	Negativo
TSI	Alcalino/Acido
Voges Proskauer	Negativo
Catalasa	Positivo

Movilidad	Positivo
Urea	Positivo
Oxidasa	Negativo
Rojo de metilo	Positivo
Medio de Cultivo	Resultado
Agar MacConkey	Colonias transparentes
Agar Eosina Azul de Metileno	Colonias transparentes o rosadas
Agar XLD	Colonias transparentes
Agar Tripticasa Soya	Colonias incoloras
Agar Salmonella-Shigella	Colonias transparentes con centro negro
06. <i>Serratia marcescens</i> 5084	
Prueba bioquímica	Resultado
Ornitina descarboxilasa	Positivo
Gram	Negativo
Gelatinasa	Positivo
Catalasa	Positivo
Indol	Negativo
Reducción de nitratos	Positiva
Movilidad	Positiva
H <sub>2</sub> S	Negativo
Oxidasa	Negativo
TSI	Alcalino/Acido
Medio de Cultivo	Resultado
Agar Sangre	Colonias color beige, beta hemolítica.
Agar Chocolate	Colonia brillante y mucosa.
Agar Tripticasa Soya	Colonia blanca
Agar MacConkey	Colonias lactosa negativo. Produce un pigmento rosado.

<b>07. <i>Enterobacter cloacae</i> 23353</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Ornitina descarboxilasa	Positivo
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Negativo
Citrato	Positivo
TSI	Acido/Acido
LIA	Alcalino/alcalino
Voges Proskauer	Positivo
Movilidad	Positivo
Indol	Negativo
Rojo de Metilo	Negativo
Gas	Positivo
H <sub>2</sub> S	Negativo
Urea	Positivo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar MacConkey	Colonia rosada lactosa positivo
Agar Tripticasa Soya	Colonia blanca amorfa
Agar Eosina Azul de Metileno	Colonia rosada con brillo metálico
<b>08. <i>Bacillus subtilis</i> 6633</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Reducción de Nitratos	Positivo
Gram	Positivo
Catalasa	Positivo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Caseína	Colonia blanca amorfa
Agar Almidón	Hidrólisis del almidón
Agar Tripticasa Soya	Colonia blanca amorfa, con centro mucoso.
Agar Sangre	colonia cremosa con beta hemolisis

<b>09. <i>Bacillus cereus</i> 10876</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Positivo
Movilidad	Positivo
Catalasa	Positivo
Utilización de almidón	Negativo
Reducción de nitratos	Negativo
Rojo de metilo	Negativo
Tinción Wirtz Conklin	Observación de esporas
Gelatinasa	Negativo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Mossel	Colonia rosada grande y cremosa
Agar Sangre	Colonia blanca con beta hemolisis
Agar Tripticasa Soya	Colonia grande y blanca
<b>10. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 700603</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Voges Proskauer	Positivo
Indol	Negativo
Urea	Positivo
TSI	Acido/acido
LIA	Alcalino/alcalino
Rojo de Metilo	Negativo
Gas	Positivo
H <sub>2</sub> S	Negativo
Citrato	Positivo
MIO	Negativo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar MacConkey	Colonia rosadas cremosas y mucosas
Agar Eosina Azul de metileno	Colonias mucosas, rosa púrpura, con ligero brillo metálico

Agar Tripticasa soya	Colonia blanca mucosa
Agar Sangre	Colonia mucosa blanca
Agar Salmonella-Shigella	Colonias rosadas cremosas y mucosas
<b>11. <i>Salmonella typhimurium</i> 13311</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Indol	Negativo
H <sub>2</sub> S	Positivo
Rojo de Metilo	Positivo
Voges Proskauer	Negativo
Citrato de Simmons	Positivo
Catalasa	Positivo
Urea	Negativo
Oxidasa	Negativo
Reducción de Nitratos	Positivo
TSI	Alcalino/acido H <sub>2</sub> S (+)
LIA	Acido/neutro- alcalino H <sub>2</sub> S (+)
Movilidad	Negativo
Ornitina descarboxilasa	Positivo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Eosina Azul de Metileno	Colonias medianas transparentes
Agar Salmonella-Shigella	Colonias incoloras con centro negro
Agar MacConkey	Colonias incoloras
Agar XLD	Rojas con centro negro
Agar Tripticasa Soya	Colonia blanca
Agar Hektoen	Colonias verde azuladas con centro negro
<b>12. <i>Salmonella enteritidis</i> 14028</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Indol	Negativo

Ornitina descarboxilasa	Negativo
Urea	Negativo
Citrato de Simmons	Positivo
Movilidad	Positiva
TSI	Alcalino/acido H <sub>2</sub> S (+)
LIA	Acido/neutro- alcalino, H <sub>2</sub> S (+)
H <sub>2</sub> S	Positivo
Medio de Cultivo	Resultado
Agar MacConkey	Colonias Incoloras
Agar Hektoen	Colonia transparente con centro negro.
Agar XLD	Crecimiento de colonias de color negra.
Agar Tripticasa Soya	Colonia blanca
Agar Salmonella-Shigella	Colonia transparente con centro negro.
<b>13. <i>Shigella flexneri</i> 9199</b>	
Prueba bioquímica	Resultado
Gram	Negativo
TSI	Alcalino/acido
LIA	Alcalino/acido
H <sub>2</sub> S	Negativo
Indol	Positivo
Ornitina descarboxilasa	Negativo
Voges Proskauer	Negativo
Rojo de Metilo	Positivo
Citrato	Negativo
Urea	Negativo
Movilidad	Negativo
Manitol	Positivo
Medio de Cultivo	Resultado
Agar MacConkey	Colonia incolora
Agar Eosina Azul de Metileno	Colonias incolora a rosa

Agar Salmonella-Shigella	Colonias transparentes, translucidas u opacas y suelen ser lisas
Agar Tripticasa Soya	Colonia pequeña blanca
Agar XLD	Colonias transparentes
<b>14. <i>Cándida albicans</i> 60193</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Positivo
Tubos germinales	Positivo
Azul de lactofenol	levadura redonda de color azul
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Chromagar para Cándida	Colonias verde esmeralda
Agar sangre	Colonia blanca, circular y seca
Agar Tripticasa Soya	Colonia blanca, seca y pequeña
<b>15. <i>Listeria monocytogenes</i> 10115</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Positivo
Hemolisis	Positivo
Prueba de CAMP	Positivo
Oxidasa	Negativo
Hidrólisis de la Esculina	Positivo
Catalasa	Positivo
Movilidad	Positivo
Manitol	Negativo
Ureasa	Negativo
Reducción de Nitratos	Negativo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Sangre	Colonia puntiformes pequeñas, semitransparetnes
Agar Oxford	Colonias blancas rodeadas de un halo negro.
Agar Tripticasa soya	Colonia blanca, pequeña

<b>16. <i>Pasteurella multocida</i> 12947</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Catalasa	Positivo
Oxidasa	Positivo
Indol	Positivo
Ornitina descarboxilasa	Positiva
Urea	Negativo
Manitol	Positivo
TSI	Acido/Acido
LIA	Alcalino/neutro
Reducción de nitratos	Positivo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Sangre	Colonia lisa de color gris azulado brillante.
Agar MacConkey	Colonias lactosa negativo
Agar Tripticasa Soya	Colonias blancas
<b>17. <i>Acinetobacter baumannii</i> 17978</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Oxidasa	Negativo
Catalasa	Positivo
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Sangre	Colonias blancas brillosas
Agar MacConkey	Colonias de 1 a 2 mm de diámetro, no pigmentada, mucoide.
Agar Tripticasa Soya	Colonia blanca pequeña
<b>18. <i>Klebsiella oxytoca</i> 49131</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Negativo
Indol	Positivo
Movilidad	Negativo

Rojo de metilo	Positivo
Ornitina descarboxilasa	Negativo
Ureasa	Positivo
TSI	Acido/Acido
LIA	Alcalino/neutro
Citrato	Positivo
Medio de Cultivo	Resultado
Agar Sangre	Colonia blanca mucosa y brillante.
Agar MacConkey	Colonia rosada mucosa
Agar EMB	Colonia mucosa rosada
Agar Tripticasa Soya	Colonia blanca mucosa grande
Agar Salmonella-Shigella	Colonia rosada cremosa y mucosa
19. <i>Salmonella typhi</i> 6539	
Prueba bioquímica	Resultado
Gram	Negativo
Citrato	Positivo
Movilidad	Positiva
Ornitina descarboxilasa	Negativo
TSI	Alcalino/acido H <sub>2</sub> S (+) Gas (+)
LIA	Alcalino/neutro H <sub>2</sub> S (+)
Ureasa	Negativo
Indol	Positiva
Medio de Cultivo	Resultado
Agar MacConkey	Colonia incolora
Agar EMB	Colonia incolora
Agar Salmonella-Shigella	Colonia incolora con centro negro
Agar XLD	Colonia roja
Agar Sulfito Bismuto	Colonia con transparente, brillante con precipitado de H <sub>2</sub> S
Agar Tripticasa Soya	Colonia incolora
Agar Rambach	Colonia rosada

<b>20. <i>Enterococcus faecalis</i> 29212</b>	
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Resultado</b>
Gram	Positivo
Catalasa	Negativo
Bilis esculina	Positivo (color negro)
<b>Medio de Cultivo</b>	<b>Resultado</b>
Agar Sangre	Colonia pequeña incolora
Agar Tripticasa Soya	Colonia pequeña blanca seca

Fuente: datos experimentales

Se trabajaron ocho muestras desconocidas con el personal técnico del laboratorio, utilizando agua potable inoculada con una cepa ATCC conocida, análisis y control del agua desmineralizada utilizada en el laboratorio con dos distintas técnicas (filtración por membrana y número más probable) y verificación del procedimiento de limpieza y desinfección de la campana de flujo laminar. En la tabla 17 se describe el tipo de muestras desconocidas, con las cuales se evaluó al personal técnico del LAMIR.

**Tabla 17. Descripción de la evaluación interna al personal técnico del -LAMIR-.**

No.	Evaluaciones realizadas	Resultado
	<b>Evaluación del proceso de limpieza y desinfección de la campana de flujo laminar</b>	
1.	Limpieza y desinfección, evaluación 1.	Insatisfactorio
2.	Limpieza y desinfección, evaluación 2.	Satisfactorio
	<b>Evaluación de la técnica de Número más probable.</b>	
3.	Agua potable contaminada con <i>E. coli</i> ATCC 25922.	Satisfactorio
4.	Control de calidad de agua desmineralizada.	Satisfactorio
5.	Agua potable del LAMIR.	Satisfactorio
6.	Agua potable contaminada con <i>E. coli</i> ATCC 25922.	Satisfactorio
	<b>Evaluación de la técnica de filtración por membrana.</b>	
7.	Control de calidad del agua desmineralizada.	Satisfactorio
8.	Control de calidad del agua desmineralizada.	Satisfactorio

Fuente: datos experimentales

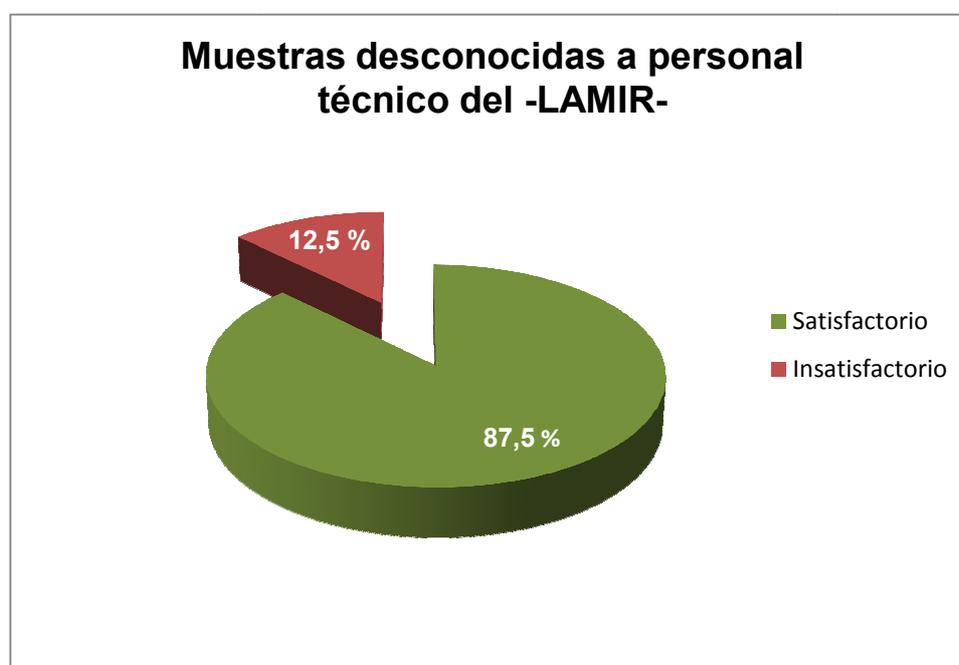
En el laboratorio es esencial verificar la competencia del personal a cargo de los análisis, ya que la confiabilidad de los resultados reportados depende en gran medida de la capacidad del personal. En la tabla 17 se presentan las frecuencias absolutas con sus respectivos porcentajes de los resultados obtenidos, esto evidencia que el personal a cargo de los análisis, está bien preparado para llevar a cabo los distintos procedimientos realizados en el laboratorio como se presenta en la grafica 9 con un 87.5% de pruebas satisfactorias.

**Tabla 17. Frecuencias absolutas y porcentajes de los resultados obtenidos de la evaluación interna del personal técnico del -LAMIR-**

Resultado	No. de evaluaciones	%
Satisfactorio	7	87.5
Insatisfactorio	1	12.5
TOTAL	8	100

Fuente: datos experimentales

**Gráfica 9. Muestras desconocidas a personal técnico del -LAMIR-.**



Fuente: datos experimentales

Adicional a los controles descritos en los objetivos de este trabajo de seminario se redactaron los siguientes documentos: Programa de auditorías internas del LAMIR, Lista de verificación (check list) para auditorías internas del LAMIR, Hoja de registro del plan de seguimiento de auditorías internas del LAMIR, Programa de Capacitaciones internas y Hoja de registro de capacitaciones recibidas (anexo 11-15).

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La función principal del laboratorio es realizar pruebas y ensayos requeridos con el fin de determinar que un producto cumple con los requisitos y especificaciones establecidas y aprobadas por Autoridades Nacionales, en la actualidad cada institución debe de demostrar su competitividad, dentro del marco de referencia comparativo, lo cual permite que se dé el mejoramiento continuo y la calidad total, así mismo garantizar la calidad requerida por los ensayos, implementando un programa de Control Interno el cual forma parte del Sistema de Calidad, para cumplir con los requisitos exigidos por la Organización Guatemalteca de Acreditación OGA, la cual tiene cimentadas sus bases en la Norma COGUANOR NTG/COPANT/ISO/IEC 17025.

Para el área de microbiología del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR- se implementó y verificó un programa de control interno, tomando en cuenta puntos críticos, según los procesos que el laboratorio realiza comúnmente. Para la realización de este seminario primero fue necesario hacer una revisión documental y física de los procesos del LAMIR, con respecto a la norma COGUANOR NGR/COPANT/ISO/IEC 17025. Es importante verificar las condiciones ambientales, para que estas no invaliden los resultados. Basados en estos requisitos se realizó el monitoreo de ambientes interno y externo del laboratorio y el ambiente y superficie de la campana de flujo laminar.

Se actualizaron las técnicas utilizadas en el -LAMIR-, para el monitoreo de ambientes y superficies, según el Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association (APHA) (46). Las cuales se describen en el anexo 7. Posteriormente se realizó el monitoreo del aire utilizando el método de impactación con un Biocolector AeroMAS-100 Eco. Este equipo es utilizado para evaluar los niveles de contaminación ya que se obtienen datos más exactos por la cantidad de aire absorbido por m<sup>3</sup> del área en estudio.

El control microbiológico del ambiente interno del laboratorio, consistió en el recuento de bacterias, mohos y levaduras, existentes en cuatro puntos determinados de laboratorio, los cuales fueron seleccionados por la afluencia del personal en los mismos (anexo 6, figura 3. Diseño del LAMIR).

Según se observa en los resultados de la tabla 6 y gráfica 1, el recuento de bacterias del ambiente interno del LAMIR, evidencian que los cuatro puntos estuvieron con recuentos elevados de bacterias, siendo el punto 1 (área cerca de la campana de medios de cultivo) el de menos carga bacteriana, lo cual es favorable para los procesos que en esta área se realizan, como lo es la preparación de medios de cultivo y el procesamiento de muestras. El punto 4 (mesa de trabajo), se encontró con una mayor carga bacteriana, este punto es el área donde existe mayor tránsito del personal que trabaja en el laboratorio, también es el área donde se hacen las lecturas de las muestras, y el sitio de descarte de cajas de petri y tubos ya inoculados.

En los meses de julio y agosto, se obtuvo un promedio de humedad relativa del 71 % y una temperatura de 26°C, los cuales fueron factores para que los recuentos se pudieran elevar, estos meses corresponden a una época que fue muy lluviosa, lo que provocó la proliferación de microorganismos en el ambiente.

En la tabla 7 y gráfica 2, se presenta el recuento de mohos y levaduras del ambiente interno del LAMIR, en los cuales el punto 3 y 4, fueron los de mayor carga fúngica. El punto 3 corresponde al ingreso del laboratorio por donde ingresan corrientes de aire del área externa al laboratorio. El punto 4 corresponde al área de mayor tránsito del personal dentro del laboratorio, ya que están ubicadas las refrigeradoras de medios de cultivo, la mesa de trabajo (es el área donde se hacen las lecturas de las muestras de laboratorio), la computadora, la incubadora, el descarte de muestras y además es el área de paso hacia las campanas de flujo laminar. En comparación con los recuentos de bacterias, los recuentos mohos y levaduras fueron más elevados, debido a que en la época lluviosa estos tienden a proliferarse.

Según la EUGGMP 2002 (Guía de Buenas Prácticas de Manufactura de la Unión Europea) referente a límites recomendados de contaminación microbiana de ambientes, el ambiente del laboratorio está clasificado como Grado D el cual corresponde a la clase 100,000. Debido a estos recuentos elevados se hizo necesario realizar pruebas de higienización. Estas incluyeron la etapa de limpieza y desinfección utilizando amonio cuaternario el cual está constituido por sales de amonio tensoactivos. Este producto forma películas bacteriostáticas creando efecto residual, es activo a amplio rango de pH, no es corrosivo y tiene buenas propiedades de humectación por ser tensoactivo, forma espuma en solución. Su espectro de actividad es muy bueno para bacterias Gram positivo, Gram negativo, mohos, levaduras y virus.

Se implementó un plan de desinfección con dos tipos de desinfectantes, con diferentes compuestos activos. El procedimiento de desinfección consiste en utilizar uno seguido del otro en el mismo día de aplicación o también en rotación durante una semana para mantener bajo control la contaminación de mohos y levaduras. Por esta razón se decidió aplicar ácido peracético el cual tiene una actividad muy buena sobre bacterias Gram positivo, Gram negativo y además sobre mohos y levaduras.

Por los conteos altos obtenidos, fue necesario utilizar concentraciones de 1200 ppm (partes por millón), para el amonio cuaternario y el ácido peracético. El orden de uso de los desinfectantes fue primero amonio cuaternario con un tiempo de exposición de 30 minutos y posteriormente un tratamiento de choque con ácido peracético, debido a que éste posee un espectro de actividad, más alto que el amonio cuaternario.

Los resultados al aplicar las dos soluciones (amonio cuaternario y ácido peracético) una seguida de la otra, indican una disminución de la carga bacteriana y fúngica (gráficas 3 y 4). Por esta razón se recomienda darle seguimiento a esta actividad, que contribuirá a que sigan disminuyendo los microorganismos suspendidos en el ambiente, los cuales pueden provocar contaminación de los distintos análisis realizados en el laboratorio.

Debido a que los ambientes contaminados de los alrededores en algunas ocasiones contribuyen a la contaminación de los ambientes de LAMIR, se definieron tres puntos específicos de las áreas anexas al laboratorio, estableciendo como punto uno y dos los laboratorios ubicados a los lados del LAMIR (anexo 6, figura 3. Diseño del LAMIR).

El punto tres definido es el área ubicada frente a la entrada del laboratorio, de acuerdo con los resultados (tabla 10 y gráfica 5), es el punto con mayor carga bacteriana y fúngica. Posiblemente la elevada contaminación se debe a que es un área muy transitada ya que es el pasillo que comunica los dos laboratorios de microbiología, así como es el área de almacenamiento de medios de cultivo, de cepas de trabajo bacterianas y fúngicas y además se evidenció deficiencia en el proceso de limpieza. Por lo descrito se hace necesario que se mejoren los procedimientos de limpieza de esta área y se recomienda a las autoridades correspondientes, la aplicación de químicos (amonio cuaternario y ácido peracético) para la desinfección de estos ambientes.

Se verificó que al realizar correctamente los procedimientos de limpieza y desinfección de la campana de flujo laminar, lo cual se detalla en el manual de equipos (anexo 9), se obtienen resultados satisfactorios. Esta área debe de estar libre de contaminación, lo cual se evaluó a través del muestreo de ambiente, por el método de impactación con el Aeroscopio MAS-100 Eco. En los diecinueve muestreos realizados, no se observó crecimiento de ningún tipo de microorganismo, que pueda afectar de alguna forma el procesamiento de muestras. Es necesario realizar muestreos regulares de este ambiente, ya que esto será parte importante de los resultados reportados a los usuarios que requieren de los servicios del Laboratorio.

La verificación de la limpieza y desinfección de las superficies de la campana de flujo laminar, se realizó por el recuento aeróbico en placa y recuento de coliformes, detectando que al no seguir correctamente los tiempos determinados para la esterilización con luz ultravioleta y flujo laminar, se puede

dar crecimiento bacteriano. Se evidenció al evaluar el proceso de limpieza y desinfección realizado por el personal del laboratorio, que no siguió correctamente las instrucciones y al realizar el monitoreo de las superficies se presentó un recuento aeróbico en placa de 1,560 UFC/cm<sup>2</sup> y presencia de coliformes. Debido a ello se procedió a tomar una acción correctiva la cual consistió en capacitar al técnico del laboratorio en el procedimiento correcto de la limpieza y desinfección de la campana de flujo laminar, y haciéndole ver la importancia de seguir los tiempos establecidos para la limpieza y desinfección.

Posteriormente se procedió a evaluar nuevamente el proceso de limpieza y desinfección, realizada por el personal técnico, obteniendo resultados satisfactorios según se puede observar en la tabla 17, gráfica 9.

Siguiendo con el programa de control interno cumpliendo con la Norma COGUANOR 17025, se verificó el funcionamiento del autoclave, realizando la evaluación con dos controles, indicadores químicos (cinta testigo) e indicadores biológicos (cepas de *Geobacillus stearothermophilus*). Para los indicadores biológicos se obtuvo un 93% (tabla 14) de efectividad para el proceso de esterilización, evaluando con dos tipos distintos de cepas de *Geobacillus stearothermophilus*. Attest Rapid 1292 con un tiempo de incubación y lectura de tres horas y Attest Rapid 1262 con un tiempo de lectura preliminar de 24 horas y confirmatorio de 48 horas. Se verificó que ambos son efectivos como indicadores de esterilización, la única diferencia es el tiempo de incubación. Se determinó que para fines de trabajo en el laboratorio son mejores las ampollas Attest Rapid 1292, de lectura de tres horas, ya que si el proceso no se efectuó adecuadamente se pueden tomar acciones correctivas más rápidamente.

La importancia de la comprobación del proceso de esterilización del autoclave radica en que se debe hacer el proceso semanal y llevar el control en la hoja de registro, ya que de no ser así se pueden dar desviaciones en los resultados como se puede observar en la grafica 8. Los dos resultados positivos fueron por tamaño de carga y variación en la temperatura, además se debe correr un control negativo, incubando una ampolla sin esterilizar, para

corroborar la calidad de las ampollas de *Geobacillus stearothermophilus*, (ver procedimiento completo en el anexo 9 Manual de equipo: autoclave).

Según el apartado 5.6.3 de la Norma COGUANOR 17025, es necesario contar con materiales de referencia certificados que proporcionen la exactitud de los resultados, para controlar la calidad del laboratorio y permitir la comparación de métodos.

Para cumplir con la normativa en el LAMIR se utilizaron 20 microorganismos ATCC, los cuales están disponibles en dos métodos de conservación (aceite mineral y en congelación con caldo Tripticasa Soya y Glicerol al 30 %). El tiempo estipulado para ambos métodos de conservación es de un año, después de este tiempo los cultivos preservados, deben ser renovados, para que sigan manteniendo su pureza y características.

En la tabla 16 se enlistan las pruebas bioquímicas y de medios de cultivo realizadas a cada cepa. Para el uso del cepario se redactó el Manual de Cepas, en el cual se detallan los métodos de conservación, el manejo de las cepas liofilizadas en hisopo y en pastilla, características de cada cepa, pruebas bioquímicas, morfología microscópica y macroscópica en distintos medios de cultivo. Este manual puede ser utilizado como guía para control interno del laboratorio y como apoyo a los laboratorios de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia el cual se encuentra en el laboratorio como copia controlada (índice del contenido del manual en anexo 8).

Se evaluó la competencia técnica del personal a cargo de los análisis del laboratorio. Los parámetros evaluados fueron: la capacidad de diagnóstico, el procesamiento de muestras, la veracidad de los resultados y el seguimiento correcto de las instrucciones de limpieza y desinfección de la campana de flujo laminar. Los cuales se detallan en el Manual de Equipos el cual se encuentra como copia controlada en el Laboratorio Microbiológico de Referencia (índice del contenido del Manual de Equipos anexo 9).

De los resultados obtenidos según se describe en la tabla 17, gráfica 9, se puede deducir que el personal técnico está preparado para realizar los procedimientos internos que le sean asignados (anexo 10) bajo la supervisión constante del profesional a cargo del laboratorio y la capacitación para actualizar sus conocimientos en tecnología y nuevas técnicas de diagnóstico.

El presente trabajo de investigación, favoreció la implementación, y verificación de algunos procesos dentro del laboratorio que son críticos en el quehacer diario del control interno del laboratorio y los cuales son parte de un sistema de calidad, y permiten a que el laboratorio sea técnicamente competente y capaz de generar resultados válidos. La implementación de los procesos permitirá en un futuro la acreditación de acuerdo a la Norma COGUANOR NTG/COPANT/ISO/IEC17025, que es el objetivo primordial del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-, obteniendo de esta manera competitividad y globalización.

## X. CONCLUSIONES

1. Para cumplir con parte del sistema de calidad, fue necesario implementar un programa de control interno el cual forma parte del cumplimiento de los requisitos establecidos por la Norma COGUANOR NGR/COPANT/ISO/IEC 17025.
2. Para los ambientes internos y externos del laboratorio se detectaron recuentos elevados de carga bacteriana y fúngica.
3. Se implementó un plan de desinfección de ambientes el cual redujo la carga bacteriana y fúngica de los ambientes internos del LAMIR.
4. De los monitoreos realizados en la campana de flujo laminar se evidenció que cumpliendo correctamente el procedimiento de limpieza y desinfección, el riesgo de contaminación de las muestras es mínimo.
5. Los dos métodos de preservación de cepas ATCC fueron conservación en aceite mineral y congelación con glicerol, siendo el más utilizado el de aceite mineral.
6. Se realizó un manual de cepas, en el cual se describió las reacciones específicas para cada prueba bioquímica y medio de cultivo.
7. Las evaluaciones realizadas al personal técnico del laboratorio evidencian que está calificado para realizar los procedimientos y análisis del laboratorio.
8. Las ampollas con esporas viables de *Geobacillus stearothermophilus* 1262, y 1292, evidencian el proceso efectivo de esterilización del autoclave, siendo más específicas que el control químico (cinta testigo) utilizado con más frecuencia.

9. El manual de equipos elaborado forma parte del sistema de calidad del laboratorio como material de apoyo para el personal del laboratorio, en la comprensión de los requerimientos técnicos relacionados con la instalación, uso y mantenimiento.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Darle seguimiento a los controles internos implementados en este seminario, en beneficio del laboratorio, para su posterior acreditación.
2. Es necesario seguir con la aplicación de químicos, lo cual ayudará a la disminución de microorganismos en el ambiente, que afectan las actividades realizadas en el laboratorio.
3. Redactar una tabla con recuentos máximos de microorganismos que se consideren aceptables para el ambiente interno del laboratorio.
4. Involucrar a todo el personal del departamento de Microbiología para que los tratamientos con químicos puedan realizarse también en los laboratorios del área de Microbiología.
5. Concientizar al personal de intendencia acerca de la importancia de realizar correctamente los procedimientos de limpieza de los laboratorios de Microbiología,
6. Programar el mantenimiento de la campana de flujo laminar para asegurar el buen funcionamiento de la misma.
7. Programar el mantenimiento del autoclave y realizar semanalmente los controles con ampollas de *Geobacillus stearothermophilus*. Utilizando de preferencia la ampolla 1292 que requiere menor tiempo de incubación.
8. Darle seguimiento a la colección de cepas de referencia, y de esta forma contar siempre con microorganismos para realizar los controles de calidad
9. Actualizar al personal técnico a cargo de los análisis, en procedimientos de los análisis realizados en el laboratorio.

10. Para poder acreditar el laboratorio bajo la Norma COGUANOR NGR/COPANT/ISO/IEC 17025 es necesario recopilar los documentos existentes en el laboratorio y cumplir con los requisitos que en ella se exigen.

## XII. REFERENCIAS

1. Curso de Gestión de Calidad para Laboratorios. Área de Tecnología y Prestación de Servicios de Salud. Unidad de Medicamentos Esenciales, Vacunas y Tecnologías en Salud. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud, 2005. 447p.
2. Hoyle D. ISO 9000 Manual de sistemas de calidad. 3ª. ed. Madrid España: Editorial Paraninfo, 1996. 443p.
3. NTC-ISO 9001:2000, Sistemas de Gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario. Bogotá Colombia. 2ª. actualización. Editada por Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación ICONTEC, 2000. 39p.
4. Alexander Servat Alberto, Calidad: Metodología para Documentar el ISO-900 versión 2000, México: Editorial Prentice Hall, 2005.
5. Nava, V M. ISO 9000:2000; Estrategias para Implementar la Norma de Calidad para la Mejora Continua. México: Editorial Limusa-Noriega, 2005.
6. Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico, 1ª. edición, Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2005. 560p (p.27-47).
7. Fontalvo Herrera T. Herramientas efectivas para el Diseño e implantación de un Sistema de Gestión de la Calidad ISO 9000:2000, Colombia: Editorial Grupo Edición Asesores del 2000, 2004. 177p.
8. Álvarez Torres Martín G., Manual para elaborar Políticas y Procedimientos, México: Editorial Panorama, 1996: 151p (p. 27)

9. Norma Internacional ISO/IEC 17025; Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración. 2ª. ed. 2005. 38p.
10. Marco E. Implantación de Sistemas de Calidad en Laboratorio Microbiológico; Normas ISO 9001:2000 e ISO 17025. Analiza Calidad Departamento de Formación. 2006. 24p. Disponible en: <http://www.analizacalidad.com/docftp/fi15717025.pdf>
11. Norma Guatemalteca Recomendada COGUANOR NGR/ISO 9000:2000; Sistemas de Gestión de Calidad-Fundamentos y Vocabulario 2ª. Revisión. Guatemala; Comisión Guatemalteca de Normas; Ministerio de Economía, 1997. 41p. Disponible en: <http://www.mineco.gob.gt/mineco/calidad/acreditacion/coguaiso9000.pdf>
12. OGA-GEC-016 Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo. Guatemala: Oficina de Acreditación Guatemalteca OGA, 2007. 29p. Disponible en:
13. ILAC-G18:2002 The Scope of Accreditation and Consideration of Methods and Criteria for the Assessments of the Scope in Testing. European Cooperation for Accreditation, 2002.
14. Chan, C.C., *et.al.* Analytical Method Validation and Instrumentation Performance Verification. USA: Wiley-Interscience, 2004
15. G-ENAC-04:2002. Guía para la Acreditación de Laboratorios que realizan Análisis Microbiológicos. 3ª. Rev. Entidad Nacional de Acreditación, 2002. 18p.
16. Villamil Gutiérrez J. E. Manual de Mantenimiento de Equipo de Laboratorio. Washington D. C: Organización Panamericana de la Salud, 2005.

17. Seidenfeld A., Quality Assurance in the Clinical Microbiology; Applying ISO 9000 Quality Standards. Washington DC: The American Association for Clinical Chemistry. 23, 8, 1997. 11p.
18. Ortega Y, Quevedo F. Control de la calidad en los laboratorios de microbiología sanitaria. 1ª. edición México DC: OPS/OMS, 1991.152p.
19. Weng Z., Hernández B, *et.al.* Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencia. Revista Cubana higiene y epidemiología. 42, 1, 2004. Disponible en [http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol42\\_1\\_04/hie04104.htm#autor](http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol42_1_04/hie04104.htm#autor)
20. Microbiology Manual MERCK® 2000. 407p. (p.4.)
21. Basu S, Pal A, *et.al.* Quality Control of Culture Media in a Microbiology Laboratory. Indian: Journal Med Microbiology 23, 3, 2005. 159-63p.
22. Arora, D. Quality Assurance in Microbiology. India: Journal of Medical Microbiology, 22, 2, 2004. 81-86p.
23. Rodríguez C. Manual de medios de cultivo. 2ª. ed, La Habana: BIOCEN, 2001. 200p.
24. L. Isenberg and Shadomy H. J. Manual of Clinical Microbiology 5ª.ed. Washington, D. C. 1991. 1203-1225p.
25. Henry Isenberg. Essential Procedures for clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC: A.S.M. Press, 1998.
26. Demian A. & Solomon. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Washington DC: American Society for Microbiology, 1997.

27. Especialidades Diagnósticas HIR Ltda, Agua desmineralizada Tipo II para uso en el Laboratorio, 2ª. Rev. Santiago de Cali, Colombia. 2007. Disponible en: [www.ihrdiagnostica.com](http://www.ihrdiagnostica.com)
28. Christon J. Hurst., *et al.* Manual of Environmental Microbiology. 2ª. Ed. Washington D.C.: ASM Press, 2002. 3-5p.
29. Pelczar, Reid, Chan. Microbiología. 4ª. Ed. México: Editorial Mc Graw-Hill. 1993. 8 - 36p.
30. Nicolle L. A Practitioner's Guide CMAJ Community-acquired; Vol:1 2006.145-175p.
31. Espinosa J. M. Control de superficies; Unidad de Trabajo. 1-4p. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/Tecnologia/TP5>.
32. Aira, M.J. Rojas T, Jato V. Fungi associated with three houses in Habana: Cuba. Grana, 41, 2, 2002. 114-118p.
33. Espinosa Bernal José María. Unidad de trabajo número 12. Control de Superficies. Control de Manipuladores.00208p. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/2623481/UT-12-Control-de-superficies>
34. VWR International. Ambientes controlados. 2010 Disponible en: <http://mx.vwr.com/app/Header?tmpl=/programs/Ambientes/ambientes.htm>
35. OMS Guía para la calidad del aire. Trad. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del ambiente (CEPIS/OPS). Ginebra, Suiza, 1992.
36. Eagle Industrial Hygiene Associates, Microbial sampling and analysis molds and bacteria. Disponible en: <http://www.eagleih.com/micro.html>

37. Díaz M. Manual de Procedimientos, Banco de Cepas y Genes; Bacteriología y Laboratorio Clínico. Colombia, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, 2004. 50 p.
38. Institute Pasteur 25 Rue du Doctor Roux 75724 Paris Cedex 15. France  
Disponibile en: [www.pasteur.fr/recherche/unites/Cncm](http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Cncm)
39. Rodríguez C. Manual de medios de cultivo. 2ª. ed. La Habana Cuba; Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN), 2001. 200p.
40. Alemán J. Conservación Bacteriana por Método Simple a Temperatura Ambiente; una alternativa viable. Revista Cubana Higiene y Epidemiología; 43,2, 2005. 40-50p
41. Grupo Colaborador GEGMIC. Recomendaciones Generales para el Control de Calidad Interno en Microbiología Clínica, Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia y Facultad de Medicina. 2004 158p. Disponible en [http://www.seimc.org/grupos/gegmic/fuentes/gegmic\\_dyc1\\_2004.pdf](http://www.seimc.org/grupos/gegmic/fuentes/gegmic_dyc1_2004.pdf)
42. Kirsop B, Doyle A. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells; A manual of Laboratory Methods. 2ª. Ed. London, Academic Press. 1991. 308 p.
43. Norma Guatemalteca Recomendada COGUANOR NGR/COPANT/ISO/IEC 17025: Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración. Guatemala; Comisión Guatemalteca de Normas; Ministerio de Economía. 30p.
44. OGA-GEC-006 Criterios para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración 16-10-2007; 12p.

45. Herrera, Aguilar, Karin Larissa, Estudio Micológico del aire en áreas ocupacionales y exteriores de la facultad de CCQQ. y Farmacia y otras áreas de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Proyecto FODECYT No. 040-07. 07-11-2008. 108p.
46. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association (APHA) 4<sup>a</sup>. ed. Washington DC. 2001. 676p.
47. 3M ESPE Attest™ 1262, 1292 Biological Indicator disponible en <http://mws9.3m.com/mws/mediawebserver.dyn?JJJJLzqBV8JcorQ15YXEO RJX7DjcU4tXmKJXmKj33333>

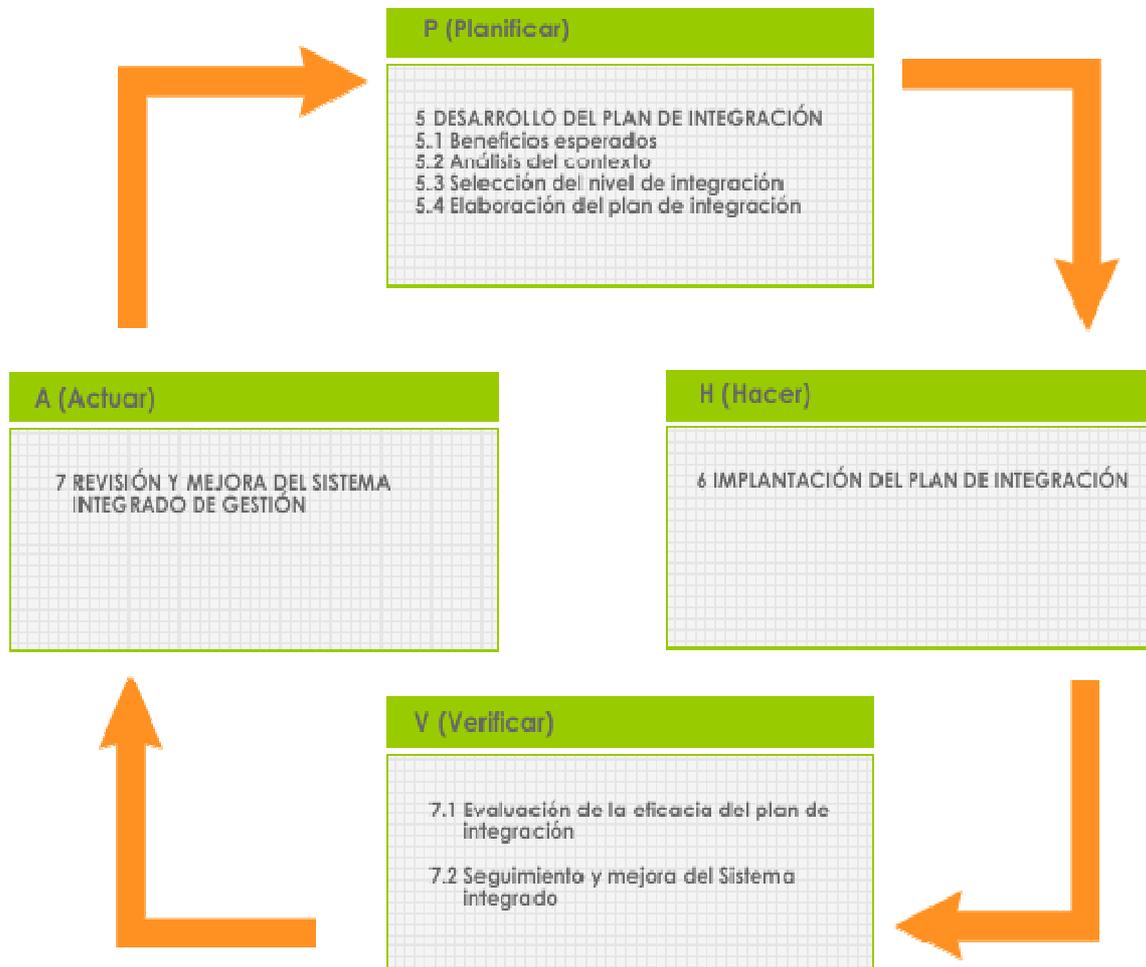
### XIII. ANEXOS

**Anexo 1. Figura 1.** La pirámide documental comprende tres niveles



**Fuente:** Nava, V. ISO 9000:2000, Estrategias para implementar la norma de calidad para la mejora continua. 1ª. Edición Editorial Limusa-Noriega Editores México. 2005.

## Anexo 2. Figura 2. Mejora continua del sistema de gestión de calidad



**Fuente:** Nava, V. ISO 9000:2000, Estrategias para implementar la norma de calidad para la mejora continua. 1ª. Edición, Editorial Limusa-Noriega Editores México. 2005.

**Anexo 3. Cuadro 1: Registro de solicitud de acción correctiva y preventiva**

<b>-LAMIR-</b>		<b>NOMBRE DEL REGISTRO</b>		<b>CÓDIGO</b>	
		<b>SOLICITUD DE ACCIÓN</b>			
Elaborado por:	Aprobado por:	Fecha Aprobación:	Fecha que rige:	Página	Versión
Dina Cuxil Claudia Salguero	Dra. Karin Herrera			1 de 1	1
SA- _____					
Correctiva: <input type="checkbox"/>		Preventiva: <input type="checkbox"/>		Mejora Continua:	
ELABORADO POR _____			Vo.Bo. DUEÑO PROCESO _____		
ACCIÓN PARA PROCESO _____			RESPONSABLE EJECUCIÓN ACCIÓN _____		
FECHA _____			FECHA DE RECIBIDO _____		
CLASIFICACIÓN:		DOCUMENTAL <input type="checkbox"/>		APLICACIÓN	
CATEGORÍA:		CRITICA <input type="checkbox"/>		MAYOR <input type="checkbox"/> MENOR	
<b>DESCRIPCIÓN DE LA NO CONFORMIDAD / OPORTUNIDAD DE MEJORA:</b>					
<b>ESPECIFICACIÓN:</b>					
<b>NATURALEZA:</b>					
<b>DETERMINACIÓN DE CAUSAS / JUSTIFICACIÓN DE LA MEJORA:</b>					
<b>ACCIONES A TOMAR:</b>					



**Anexo 4. Tabla 1.** Propiedades físicas y químicas del agua desmineralizada

Parámetro	Parámetros	Unidades
Aspecto	Líquido incoloro transparente	
pH 25°C	entre 5.07 y 7	
Conductividad específica	<de 5	mS/cm*
Cadmio	< 0.01	mg/L
Cobre	< 0.01	mg/L
Cromo total	< 0.01	mg/ L
Níquel	< 0.02	mg/ L
Plomo	< 0.01	mg/ L
Zinc	< 0.01	mg/ L
Calcio	< 0.01	mg/ L
Magnesio	< 0.007	mg/ L
Cloruros	< 1	mg/ L
Sodio	< 0.01	mg/ L
Potasio	< 0.1	mg/ L
Dureza Total	< 0.3	mgCaCo3/ L
CO <sub>2</sub>	Negativo	

\*

microsiemens/cm

**Fuente:** Especialidades Diagnósticas HIR Ltda, AGUA DESMINERALIZADA TIPO II para uso en el laboratorio, Santiago de Chile, Colombia Rev. 2 08/2007 [www.ihrdiagnostica.com](http://www.ihrdiagnostica.com)

**Anexo 5. Tabla No. 2:** Clasificación ISO, según número de partículas en el ambiente

Clases	Número de partículas / m <sup>3</sup> (0.5 µm)	Clasificación ISO
Clase 1	35	Clase 3
Clase 10	352	Clase 4
Clase 100	3,520	Clase 5
Clase 1,000	35,200	Clase 6
Clase 10,000	352,000	Clase 7
Clase 100,000	3,520,000	Clase 8

**Fuente:** NASA standards for clean rooms and work station for the microbially controlled environment



**Anexo 7. Técnicas microbiológicas**

**Anexo 8. Contenido del Manual de cepas del Laboratorio  
Microbiológico de Referencia -LAMIR-.**

<b>Código del documento</b>	<b>Contenido</b>	<b>Páginas</b>
P01-C	Programa General del Ceparío	03
C.POE-01	Manejo de cepas ATCC	09
C.POE-02	Conservación de cepas en aceite mineral	06
C.POE-03	Conservación de cepas en congelación	10
CEP-01	<i>Escherichia coli</i>	05
CEP-02	<i>Staphylococcus aureus</i>	06
CEP-03	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	06
CEP-04	<i>Proteus vulgaris</i>	05
CEP-05	<i>Proteus mirabilis</i>	04
CEP-06	<i>Serratia marcescens</i>	04
CEP-07	<i>Enterobacter cloacae</i>	05
CEP-08	<i>Bacillus subtilis</i>	04
CEP-09	<i>Bacillus cereus</i>	05
CEP-10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	05
CEP-11	<i>Salmonella typhimurium</i>	06
CEP-12	<i>Salmonella enteritidis</i>	05
CEP-13	<i>Shigella flexneri</i>	05
CEP-14	<i>Candida albicans</i>	04
CEP-15	<i>Listeria monocytogenes</i>	06
CEP-16	<i>Pasteurella multocida</i>	04
CEP-17	<i>Acinetobacter baumannii</i>	04
CEP-18	<i>Klebsiella oxytoca</i>	04
CEP-19	<i>Salmonella typhi</i>	06
CEP-20	<i>Enterococcus faecalis</i>	04

**Anexo 9. Contenido del Manual de Equipos del Laboratorio  
Microbiológico de Referencia -LAMIR-.**

<b>Código del documento</b>	<b>Contenido</b>	<b>Páginas</b>
P02-E	Programa de Mantenimiento de Equipos	04
E.POE-01	Autoclave	13
R1.E.POE-01	Autoclave	01
R2.E.POE-01	Autoclave <i>G. stearothermophilus</i>	01
E.POE-02	Balanza digital	04
R1.E.POE-02	Balanza digital	01
E.POE-03	Baño de María	04
R1.E.POE-03	Baño de María	01
E.POE-04	Campana de flujo laminar	14
R1.E.POE-04	Campana de flujo laminar	01
E.POE-05	Incubadoras	06
R1.E.POE-05	Incubadoras	01
E.POE-06	Microscopio	16
E.POE-07	Potenciómetro	09
R1.E.POE-07	Potenciómetro	01
E.POE-08	Sistema de refrigeración	10
R1.E.POE-08	Refrigerador	01
R2.E.POE-08	Congelador	01
R3.E.POE-08	Cámara de refrigeración	01
E.POE-09	Bomba de vacío	03
E.POE-11	Contador de colonias	03
E.POE-12	Incinerador	04
R1.P02-E	Ficha técnica mantenimiento equipos	01

**Anexo 10.** Hojas de reporte de muestras desconocidas

**Anexo 11.** Programa de Auditorías internas del LAMIR.

**Anexo 12.** Lista de verificación Auditorías internas del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-.

**Anexo 13.** Hoja de registro del plan de seguimiento de Auditorías internas del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-.

**Anexo 14.** Programa de capacitaciones internas del Laboratorio Microbiológico de Referencia -LAMIR-.

**Anexo 15.** Hoja de registro de capacitaciones recibidas, del Laboratorio