



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

**“EVALUACIÓN DE LA FASE PREANALÍTICA COMO INFLUENCIA EN LA CONFIABILIDAD DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL LABORATORIO CLÍNICO AMBALAB”.**

Requisito previo para optar por el Título de Licenciada en Laboratorio Clínico

**Autora:** Acosta Parra, Estefanía Pamela

**Tutora:** Bqf. Ramos Ramírez, Martha Cecilia

Ambato – Ecuador

Diciembre, 2014

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el tema:

**“EVALUACIÓN DE LA FASE PREANALÍTICA COMO INFLUENCIA EN LA CONFIABILIDAD DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL LABORATORIO CLÍNICO AMBALAB”** de Estefanía Pamela Acosta Parra estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, Junio del 2014

LA TUTORA

.....  
Bqf. Martha Ramos

## **AUTORÍA DE TRABAJO DE GRADO**

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación **“EVALUACIÓN DE LA FASE PREANALÍTICA COMO INFLUENCIA EN LA CONFIABILIDAD DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL LABORATORIO CLÍNICO AMBALAB”**, como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y propuesta son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autora de este trabajo de grado.

Ambato, Junio del 2014

LA AUTORA

.....  
Estefanía Pamela Acosta Parra

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizó a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de esta tesis o parte de ella un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi tesis con fines de difusión pública; además apruebo la reproducción de esta tesis, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autora.

Ambato, Junio del 2014

## **LA AUTORA**

.....  
Estefanía Pamela Acosta Parra

## **APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR**

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación, sobre el tema **“EVALUACIÓN DE LA FASE PREANALÍTICA COMO INFLUENCIA EN LA CONFIABILIDAD DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEL LABORATORIO CLÍNICO AMBALAB”**, de Estefanía Pamela Acosta Parra, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, Diciembre del 2014

Para constancia firman

.....  
PRESIDENTE /A

.....  
1<sup>er</sup> VOCAL

.....  
2<sup>do</sup> VOCAL

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a Dios y a mis padres.

A Dios por guiar mi camino con sabiduría e inteligencia durante toda mi vida estudiantil fortaleciendo tanto mi personalidad como mis conocimientos científicos y técnicos para ser una profesional con valores morales y éticos, a mis padres Jorge y Nidian porque gracias a su esfuerzo han hecho posible mis estudios superiores apoyándome además de una manera tan incondicional y siempre con palabras de aliento confiando siempre en mi capacidad y esmero de estudio. Este triunfo es de ustedes.

Pamela Acosta

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a cada uno de los docentes que forman parte de la Universidad Técnica de Ambato, así mismo a toda persona que directa o indirectamente participaron para que esta tesis se haga realidad quienes de alguna manera me han incentivado para crecer no solo profesionalmente sino moralmente también.

A mi Tutora de tesis Bqf. Martha Ramos por su tiempo y sus conocimientos que han guía el desarrollo de este proyecto además de la amistad y confianza que me ha brindado han sido posible la culminación de esta tesis. A todos ellos mil gracias.

Pamela Acosta

## ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR  
AUTORÍA DE TRABAJO DE GRADO  
DERECHOS DE AUTOR  
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO  
DEDICATORIA  
AGRADECIMIENTO

### **CAPÍTULO I PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

1. TEMA:.....	3
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	7
1.4. OBJETIVOS.....	8

### **CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO**

2.1. ANTECEDENTES.....	9
2.2. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA.....	11
2.3. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES.....	14
2.4. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	15
2.5. HIPÓTESIS.....	29
2.6. SEÑALAMIENTO DE LA HIPÓTESIS.....	29

### **CAPÍTULO III MARCO METODOLÓGICO**

3.1. ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN.....	30
3.2. MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	30
3.3. NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN.....	31
3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	31
3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	32
3.6. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.....	34
3.7. INFORMACIÓN DE LABORATORIO.....	34
3.8. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS.....	35



## **CAPÍTULO IV**

### **ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

4.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS .....	45
4.2. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS.....	54
4.3. VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS .....	54

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1. CONCLUSIONES.....	55
5.2. RECOMENDACIONES .....	56

## **CAPÍTULO VI**

### **PROPUESTA**

6.1. DATOS INFORMATIVOS .....	57
6.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA .....	58
6.3. JUSTIFICACIÓN.....	59
6.4. OBJETIVOS.....	59
6.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS DE LA PROPUESTA .....	59
6.6. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	60
6.7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA .....	60
6.8. METODOLOGÍA- MODELO OPERATIVO .....	88
6.9. ADMINISTRACIÓN .....	89

ANEXOS .....	90
--------------	----

BIBLIOGRAFÍA:.....	98
--------------------	----

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA No 1.</b> Control de equipo y sus mediciones .....	23
<b>TABLA No 2.</b> Control de calidad de los medios.....	25
<b>TABLA No 3.</b> Parámetros de desempeño para categorías I de prueba .....	28
<b>TABLA No 4.</b> Desviaciones estándar relativas en función a las UFC en placas .	29
<b>TABLA N 5.</b> Referencia de número de bacterias de los tubos patrones .....	40
<b>TABLA No 6. ....</b> Ítems en la fase preanalítica de la preparación de los medios de cultivos. ....	45
<b>TABLA No 7.</b> Lecturas de la temperatura de la incubadora, setead a 37°C.....	46
<b>TABLA No 8.</b> Screening de esterilidad de los medios de cultivos. ....	48
<b>TABLA No 9.</b> Control de calidad pH de los medios de cultivos. ....	49
<b>TABLA No 10.</b> Resultados de UFC utilizadas como referencia en Agar Mueller-Hinton.....	49
<b>TABLA No 11.</b> Resultados de las diluciones en UFC del Agar Mac-Conkey. ...	50
<b>TABLA No 12.</b> Resultados de las diluciones en UFC del Agar Sangre. ....	51
<b>TABLA No 13.</b> Resultados de las diluciones en UFC del Agar Mueller-Hinton.	53
<b>TABLA No 14.</b> Resultados de las diluciones del Agar Sabouraud.....	54

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO No 1.</b> Diluciones por cuenta viable .....	40
<b>GRÁFICO No 2.</b> Límites de control de la temperatura tras la verificación interna de la incubadora seteada a 37°C .....	47
<b>GRÁFICO No 3.</b> Screening de esterilidad de los medios de cultivos. ....	48
<b>GRÁFICO No 4.</b> Resultados de las diluciones en UFC de Agar Mac-Conkey... 50	
<b>GRÁFICO No 5.</b> Resultados de las diluciones en UFC del Agar Sangre. ....	52
<b>GRÁFICO No 6.</b> Resultados de las diluciones en UFC del Agar Mueller-Hinton. ....	53

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**“EVALUACIÓN DE LA FASE PREANALÍTICA COMO INFLUENCIA  
EN LA CONFIABILIDAD DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE  
MICROBIOLOGÍA DEL LABORATORIO CLÍNICO AMBALAB”**

**Autora:** Acosta Parra, Estefanía Pamela

**Tutora:** Bqf. Ramos Ramírez, Martha Cecilia

**Fecha:** Junio del 2014

**RESUMEN**

El presente trabajo tiene como propósito evaluar la fase preanalítica como influencia sobre la confiabilidad de los resultados que proporciona el laboratorio dentro del área de microbiología clínica, siguiendo el protocolo actual que se lleva a cabo en el mismo.

Los datos del trabajo se realizaron aplicando el método tanto cualitativo como cuantitativo, dando a conocer que en gran parte la calidad de los resultados si dependen de los protocolos que incluye la fase preanalítica, y además los resultados que proporciona el laboratorio son confiables, sin mencionar que a más de estos factores pueden influir otros, dentro de ellos y el principal es el comportamiento de los microorganismos puesto que actúan de manera independiente aunque se les administre los nutrientes necesarios para su desarrollo pues organismos vivos, de ahí la importancia de poner en práctica el control de calidad dentro de esta área. Además la investigación aportó con un manual de control de calidad interno que comprende de información que complemente los protocolos llevados a cabo dentro del área que nos permitan evaluar no sólo de una forma cualitativa sino cuantitativa también.

**PALABRAS CLAVES:** *FASE\_PREANALÍTICA, REHIDRATACIÓN, MEDIOS\_CULTIVO, CALIDAD\_RESULTADOS, MICROBIOLOGÍA*

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**“EVALUACIÓN DE LA FASE PREANALÍTICA COMO INFLUENCIA  
EN LA CONFIABILIDAD DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE  
MICROBIOLOGÍA DEL LABORATORIO CLÍNICO AMBALAB”**

**Autora:** Acosta Parra, Estefanía Pamela

**Tutora:** Bqf. Ramos Ramírez, Martha Cecilia

**Fecha:** Junio del 2014

**SUMMARY**

This research work has the purpose of evaluate the pre-analytical phase as an influence on the reliability of the results provided by the laboratory in the area of clinical microbiology, following the current protocol is carried out in itself.

The data of work were performed using the method both qualitative and quantitative, letting us know that much of the quality of the results depend on whether the protocols including the preanalytical phase, and also the results provided by the laboratory are reliable, not to mention that most of these factors can influence others within them and the main is the behavior of microorganisms as they act independently although they are given the nutrients necessary for their development as living organisms, hence the importance of implementing quality control in this area.

Besides the research brings a manual of internal quality control comprising information that complements those carried out within the area protocols that allow us to assess not only a qualitative but also quantitative.

**KEYWORDS:** *PREANALYTICAL\_PHASE, REHYDRATION,  
MIDLE\_CULTIVTION, RESULTS\_QUALITY, MICROBIOLOGY*

## GLOSARIO

**Validación:** la validación es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

**Etapa preanalítica extralaboratorio:** comprende desde que el médico solicita la prueba hasta que el espécimen/muestra llega al laboratorio.

**Etapa preanalítica intralaboratorio:** comprende desde que el espécimen/muestra llega al laboratorio hasta que se produce el análisis del mismo.

**Interferencia:** desviación clínicamente significativa en la medida de la concentración de un analito, debida al efecto de otro componente o propiedad de la muestra.

**Protocolo analítico:** conjunto de magnitudes biológicas de demostrada efectividad para el diagnóstico, seguimiento y terapéutica de episodios o procesos clínicos bien definidos.

**Error de laboratorio:** fallo al completar una acción planificada como se deseaba o utilización de un plan incorrecto para alcanzar un objetivo; defecto producido en cualquier parte del ciclo del laboratorio, desde que se solicitan las magnitudes hasta que se informan los resultados y se interpretan.

**Barreras microbiológicas:** es un dispositivo o sistema que evita o limita la migración de microorganismos.

**Área contaminada.-** Área donde se manipulan microorganismos de riesgo.

**Precisión:** Es el grado de concordancia entre los resultados independientes de una medición, obtenidos en condiciones estipuladas, ya sea de repetibilidad o de reproducibilidad y depende de la distribución de los resultados sin estar relacionada con el valor verdadero.

**Repetibilidad:** Coincidencia entre los resultados de mediciones sucesivas realizadas en las mismas condiciones de medición.

**Reproducibilidad:** Coincidencia entre los resultados de mediciones realizadas en diferentes condiciones de medición en un mismo laboratorio o entre 2 laboratorios.

**Descontaminación:** se refiere por un lado a la esterilización o destrucción completa a todos los microorganismos incluyendo las esporas bacterianas y por otro lado a la

desinfección o destrucción y eliminación de tipos precisos de microorganismos en objetos contaminados.

**Agente infeccioso:** es todo virus bacteria, hongo, rickettsia, protozoarios o helmintos capaz de producir una infección.

**Agente biológico.-** Todo organismo viviente capaz de causar infección, enfermedad o muerte en el ser humano con inclusión de los genéticamente modificados y endoparásitos humanos susceptibles de originar cualquier tipo de infección, alergia o toxicidad.

**Esterilización.-** Proceso que mediante el empleo de agentes físicos y/o químicos, produce la inactivación total de todas las formas de vida microbiana en forma irreversible (estado esporulado y vegetativo).

**Microorganismo.-** Toda entidad microbiológica, celular o no, capaz de reproducirse o de transferir material genético.

## **ABREVIATURAS**

**ISO:** Organismo Internacional de Estandarización.

**ENAC:** Entidad nacional de acreditación.

**SEIMC:** Control de calidad de la sociedad española de infecciones y microbiología.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud.

**OAE:** Organismo de Acreditación Ecuatoriano.

**ATCC:** American Type Culture Collection.

**COLABIOCLI:** Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica.

**ISA:** International Federation of the National Standardization Associations.

**SGC:** Sistema de Gestión de Calidad.

**EMB:** Eosin Methilen Blue.

**TSI:** Triple Sugar Iron.

**MIO:** Motilidad Indol Ornitina.

**SIM:** Indol Manitol Salado.

**USP:** United States Pharmacopei.

**CLSI:** Clinical Laboratory Standard Institute.

**UFC:** Unidades formadoras de colonias.



## INTRODUCCIÓN

La importancia de llevar a cabo procedimientos de calidad para la identificación, tratamiento y diagnóstico final de un microorganismo causante de patologías clínicas, es un tema de mucho interés. Pues del conjunto de procedimientos que seguimos juegan un papel muy importante en el resultado final, considerando la poca información que existe de este tema.

La fase preanalítica se considera de mucha importancia, ya que es donde ocurren errores con más frecuencia, ya que de esta depende en gran medida, la integridad del método que se lleva a cabo para la elaboración de los medios para su posterior análisis. Ya que fallos en ésta, pueden afectar en la fiabilidad de los resultados, repetición de exámenes y costos adicionales para el laboratorio.

Sin mencionar que el área de microbiología es un sitio donde debe guardar mayor seguridad, ya que puede existir un riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas para el personal que manipule las muestras biológicas y por otro lado también debe practicarse procedimientos seguros durante el estudio de las muestras, de ahí la importancia del control de calidad.

Al investigar el método que se está utilizando en el laboratorio durante el estudio se tomó las medidas preventivas que pueden influir en el fase preanalítica tanto dentro del área de trabajo como de los equipamientos utilizados para la elaboración de los medios de cultivo para el posterior análisis a partir de la cepa control *E. coli* ATCC 11775 y con los resultados realizar un análisis estadístico que corroboren los resultados. El presente trabajo se lo ha dividido en varias secciones, en las cuales con la ayuda de datos bibliográficos se ha complementado la información y además se ha evaluado la calidad de los resultados proporcionados por el laboratorio, rescatando:

- Introducción
- Objetivo general

- Objetivos específicos
- Definiciones
- Evaluación de la fase preanalítica y resultados finales
- Control de calidad del área de microbiología
- Planes de acción
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Bibliografía
- Anexos

Una vez proporcionada la información correspondiente para tomar planes correctivos dentro del laboratorio, es responsabilidad del autor para difundir ésta información y concientizar al personal que labora en el laboratorio, pues es importante llevar a cabo protocolos que garanticen procesos seguros de las muestra y del personal.

# **CAPÍTULO I**

## **EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **1. TEMA DE INVESTIGACIÓN**

“Evaluación de la fase preanalítica como influencia en la confiabilidad de los resultados en el área de microbiología del laboratorio clínico Ambalab”.

### **1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.2.1. Contextualización**

A nivel del Ecuador el control de calidad es un parámetro que no se lo aplica del todo bien, en el país no todos los laboratorios cumplen con normas de control de calidad bajo los parámetros correspondientes, aunque La Ley Orgánica de la Salud no cuenta con normas específicamente de laboratorios de diagnóstico clínico, en el reglamento de funcionamiento si se establece varios requisitos para ello, pero hay que considerar que estos requisitos para obtener el permiso no garantizan que exista un correcto funcionamiento considerando que en la actualidad no existe un estándar de control de calidad que pueda determinar la apreciación de los resultados. Siendo el Organismo de Acreditación Ecuatoriano (OAE), los evaluadores que promueven los sistemas de gestión de calidad, que por otro lado el Organismo Internacional de Estandarización (ISO) a nivel mundial y en América Latina la Organización Panamericana de la Salud (OPS) junto con la Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI) quienes además de promover la elaboración de manuales de procedimientos para la certificación y acreditación de laboratorios

clínicos a través de normas ISO, promueve la gestión de procesos, la mejora continua y la autoevaluación, aunque estas entidades de alguna manera rigen estos parámetros, hay que considerar que el mayor problema en el país como ya habíamos mencionado anteriormente es la falta de un estándar de control de calidad es decir, de laboratorios de referencia que difundan controles para evaluar la calidad de los resultados y validar la calidad de servicio (Quiroz, M. 2012).

Haciendo un análisis a nivel del Ecuador se estima que el 46% de los laboratorios no tienen permiso de funcionamiento, y en algunas provincias al menos el 50% carecen también de permisos, por esta misma circunstancia no ejecutan todas las medidas de control de calidad, considerando que el 70% de los diagnósticos se basan en los resultados de laboratorio, dentro de un estudio en el país se ha determinado que la mayor parte de los errores se dan en el fase preanalítica con una frecuencia de 17%, 31% y 71%, la fase analítica en un 13-32% y la fase post-analítica en un 9-31% de los errores atribuibles al laboratorio clínico, entre el 10 y el 12,5% tendrían repercusión desfavorable en la conducta del médico o en la salud del paciente debemos considerar que por la poca importancia que se le da a esta fase en el procesamiento de las muestras, ya que es en donde se pueden destruir componentes o propiedades a analizar. Tomando en cuenta también la falta de implementación de indicadores dentro del laboratorio que ayudarían a la mejora continua en la calidad de los resultados no son puestos en práctica (Hinostroza, M. 2012).

A nivel de la provincia de Tungurahua el tema no ha sido muy estudiado, al igual que en el país existen laboratorios que prestan sus servicios solo con la certificación otorgada por el Ministerio de Salud Pública, podríamos decir que aproximadamente 60 laboratorios estarían funcionando clandestinamente, considerando el poco o casi nulo control que se da en todos los cantones de Tungurahua, la mayor parte de las investigaciones se basan más sobre las normas de bioseguridad se conoce que entre las consecuencias que pueden presentarse en el personal de salud son infecciones tipo respiratorio aunque se tiene referencias que no solo el personal de laboratorio sino todo el personal de salud tienen conocimientos suficientes de bioseguridad

pero no cumplen del todo bien las normas de control de calidad, tomando en cuenta que la práctica de todas estos factores juegan un papel muy importante para brindar resultados de calidad (Bazurto, C. 2012).

En el cantón Ambato lo más cercano a la aplicabilidad de control de calidad lo hacen bajo las normas ISO 9001 siendo la válida para la acreditación de los laboratorios clínicos las normas ISO 15189 que mida la competencia técnica netamente, tomando en cuenta que este tema es un asunto de mucha importancia para proporcionar resultados confiables que encaminen a un diagnóstico correcto, pero se tiene conocimiento de la importancia sobre normas de bioseguridad y la infraestructura del laboratorio para evitar que exista transmisión de infecciones al personal, en esta situación se hace hincapié en la mala infraestructura del mismo, considerando que el laboratorio clínico debe poseer espacios determinados para cada área, tomando en cuenta también que influyen otros factores que no solo podrían contaminar al personal sino también a las muestras (Gallegos, F. 2009).

### **1.2.2. Análisis Crítico**

Tomando en cuenta que la calidad de los resultados entregados diariamente son un parámetro fundamental que influyen en un diagnóstico, por ello es importante realizar procedimientos que aseguren resultados confiables, para lo cual dependen de factores, no solo del personal, sino de otros factores externos a estos. Para ello es importante que el personal de laboratorio esté debidamente capacitado para su ejecución. Es de vital importancia conocer las causas principales que contribuyan con el aumento del riesgo de contaminación tanto de las muestras como la posible contaminación del personal para, con la información necesaria proceder a plantear soluciones al problema.

Debemos tomar en cuenta que el mal empleo de las barreras de protección, errores durante la ejecución de la fase preanalítica y la manipulación inadecuada durante la preparación de medios de cultivo son puntos primordiales que influyen

directamente en la confiabilidad de los resultados, así también el mal funcionamiento del equipamiento y otros factores externos como el aire son parámetros importantes que hay que tomarlos en cuenta también para asegurarnos que la calidad de los resultados sean los mejores; así también asegurando la protección del personal.

### **1.2.3. Prognosis**

La inadecuada utilización de las medidas de control de calidad en la ejecución de los procedimientos para la identificación de los agentes causales, influye mucho en un estudio microbiológico correcto, ya que de no practicarse todas estas normas pueden afectar peligrosamente en la calidad de los resultados entregados a los pacientes, tomando en cuenta que también puede afectar los criterios de calidad de los medios y por otro lado la formación de fuentes reservorios que podrían aumentar la proliferación y resistencia, así mismo también aumentando el riesgo de contaminación ya sea de medios de cultivo y del personal de laboratorio hasta el punto de transmitirse enfermedades por contacto, vía respiratoria, ocular y bucal.

### **1.2.4. Formulación del problema**

¿La fase preanalítica influye en la confiabilidad de los resultados en el área de microbiología del laboratorio clínico Ambalab?

### **1.2.5. Preguntas directrices**

¿Cuáles son los puntos críticos que influyen en la preparación de los medios de cultivos?

¿Cumplen con las condiciones de calidad los medios de cultivo reconstituidos?

¿Poseen un manual de control de calidad interno para el área de microbiología?

### **1.2.6. Delimitación**

#### **Delimitación espacial**

La investigación se realizará en el laboratorio “AMBALAB” ubicado en la calle Bolívar y Constantino Fernández

#### **Delimitación temporal**

La investigación se realizará desde el mes de noviembre hasta junio del año 2014.

#### **Delimitación del contenido**

**Campo:** Laboratorio Clínico

**Área:** Microbiología

**Aspecto:** Fase preanalítica (preparación de los medios)

**Objetivo de estudio:** Confiabilidad resultados

### **1.3. JUSTIFICACIÓN**

La investigación se considera de interés porque en los servicios que presta un laboratorio clínico y más en una área donde hay mayor riesgo de contaminación como es la de microbiología no solo para las muestras sino también del personal, la calidad es un parámetro del cual depende gran parte la confiabilidad de los resultados, la investigación nos permitirá evaluar la calidad de los resultados y a su vez conocer la validación del procedimiento que están actualmente aplicando dentro del laboratorio que servirán de base para el diagnóstico y el posterior tratamiento.

La investigación se considera de mucha importancia porque al realizar las pruebas correspondientes estableceremos resultados y con los mismos estableceremos soluciones con el objetivo del mejoramiento de los resultados microbiológicos realizados por el laboratorio, así como también evaluar los conocimientos y uso de barrera que ponen en práctica el personal de esta institución, pues es importante que se garantice que los procesos de desinfección den un resultado de calidad y aseguren su propia seguridad. En esta investigación se realizará técnicas microbiológicas que

nos permitirá la evaluación tanto de la calidad de los medios de cultivo utilizados para la identificación del microorganismo objeto de estudio.

Además considerando que esta investigación es factible porque contamos con el apoyo de las autoridades del correspondiente establecimiento ya que es el sitio donde se tomarán las muestras y se realizará el debido procesamiento, además se cuenta con todo el equipamiento necesario para llevar a cabo la identificación. Siendo beneficiarios la institución y el personal de laboratorio ya que con los resultados de la investigación se presentarán medidas de control para mejorar la calidad de los resultados y garantizar mejor la seguridad del personal.

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1. Objetivo General**

Evaluar la fase preanalítica como influencia en la confiabilidad de los resultados en el área de microbiología del laboratorio clínico Ambalab.

### **1.4.2. Objetivos Específicos**

- Identificar los puntos críticos que influyen en la preparación de los medios de cultivos.
- Evaluar las condiciones de calidad que deben poseer los medios de cultivo reconstituidos.
- Elaborar un manual de control de calidad interno para el área de microbiología.



## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. ANTECEDENTES**

Según la autora Ortíz Dina, menciona en su investigación “Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica”, realizada en el año 2008, menciona que si puede ser documentada la técnica recomendada por la USP.30.2007 argumenta que es reproducible y repetible demostrando plena confiabilidad, pues se elaboró el protocolo de validación y una técnica del análisis de un producto líquido preservado con agentes parabenos, producidos en la industria farmacéutica que estableció porcentajes de recuperación entre 90 al 127% demostrando así la exactitud del método. Asegurando que mientras se realizaba el proceso se descartó cualquier tipo de contaminación y la diferencia no fue significativa en cuanto a los recuentos teniendo en cuenta el factor tiempo (Ortíz, D. 2008).

Según el autor Gómez C. a través de la investigación “Calidad en la recogida de muestras microbiológicas en la Unidad de Urgencias de Pediatría del Hospital Universitario Central de Asturias” realizada en el año 2013, menciona que a través de la investigación se ha identificado errores en el proceso para la obtención de muestras tanto en el material, técnica, transporte y conservación, arrojando que la mayor parte de los errores pueden influir directamente en la contaminación de la muestra por lo tanto en la calidad de la misma, pues además se pudo observar un alto porcentaje de profesionales de enfermería y auxiliares de enfermería que dicen conocer los protocolos para la obtención de muestras pero también reconocen no seguirlo (Gómez, C. 2013).

Según el autor Delgado M. menciona en su investigación “Control de calidad interno en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Dr. Miguel Enríquez” realizada en el año 2009, pues menciona en su estudio realizado en diferentes medios de cultivo tanto en cajas Petri como en tubos de ensayo se observó que los medios Agar Sangre de Carnero, Agar Mueller-Hinton, Agar para conteo en placas (AGT) y Agar Chocolate, fueron los de mayor contaminación esto se determinó, que si existió mayor contaminación en estos cultivos, fue porque son medios muy enriquecidos pues permiten el crecimiento y desarrollo de muchos microorganismos, entre los principales producto de contaminación encontramos *Staphylococcus coagulasa* negativa, Bacilos Gram positivos y hongos ambientales. Mientras que en los tubos de ensayo la contaminación fue nula. Se determinó que la contaminación fue por no contar con un área física destinada solamente para esta actividad, y la mala manipulación durante el llenado de las cajas (Delgado, M. 2009).

Callejas, L. menciona en la siguiente investigación “Verificación de Procesos de Limpieza y Desinfección de los Laboratorios: Aguas y Lodos, Inmunología Especializada y Citometría de Flujos, Microbiología de los Alimentos, Microbiología Ambiental y de Suelos” realizada en el 2009, menciona que después de una serie de pruebas en las superficies del área de microbiológica, los microorganismos que más se observaron fueron hongos, así también como bacterias mesófilos aerobias Gram positivas y esporulados, tomando como evidencia que el desinfectante usado fue el hipoclorito reduciendo la carga microbiana en un 90%, es decir es muy efectivo sobre las bacterias pero no tienen el mismo efecto sobre los hongos, e indagaron que esto se debía a la falta de desinfección del aire por lo cual recomendaban la utilización de Tego al 0.1-0.2%. Quizás por esta circunstancia aumente el riesgo de transmisión de microorganismos a las muestras, factor que no se tomó en cuenta en la investigación anterior (Callejas, L. 2009).

## **2.2. FUNDAMENTACIÓN FILOSÓFICA**

### **2.2.1. Fundamentación Epistemológica**

La investigación se basa en el mejoramiento del servicio al paciente procurando la seguridad del personal clínico.

Los procedimientos para la ejecución de las pruebas microbiológicas utilizadas por el personal son establecidas de acuerdo con los protocolos de la institución, permitiendo la obtención de los resultados microbiológicos así mismo con las correspondientes prácticas de desinfección de dicha área, de esta manera el presente trabajo aportará en la mejora de normas de control de calidad tanto en el nivel de desinfección como en el buen funcionamiento del equipamiento que son necesarios durante la elaboración de los medios, permitiendo resultados de calidad que contribuyen en un diagnóstico final.

### **2.2.2. Fundamentación Axiológica**

La presente investigación se realizará con todo el profesionalismo basado tanto en la ética como en la moral para obtener resultados verdaderos que de alguna u otra manera aporten a la mejora de los servicios que presta esta entidad, así mismo practicando la responsabilidad en la ejecución de los procesos para la identificación de microorganismos, para después transmitir con el mayor respeto la información pertinente a las autoridades del laboratorio y establecer soluciones en el mejoramiento de la calidad de los exámenes.

### **2.2.3. Fundamentación Legal**

**Reglamento para el funcionamiento de los laboratorios clínicos**

**Ministerio de Salud Pública del Ecuador**

## **CAPÍTULO V**

### **DE LA INSTALACIÓN E INFRAESTRUCTURA**

**Art. 18.-** Los laboratorios clínicos no compartirán espacios con vivienda, ni se instalarán en zonas de alto riesgo a desastres naturales y estarán alejados de focos de contaminación.

**Art. 19.-** El área física asignada a un laboratorio clínico dependerá de la tipología y del número de pacientes a ser atendidos y cumplirá con los siguientes requisitos mínimos:

- a) Buena ventilación;
- b) Buena iluminación natural y artificial; las ventanas no deben permitir la entrada de agua, insectos u otros elementos contaminantes; contarán con mallas metálicas, según la necesidad local;
- c) Cubierta, pisos y paredes lisos y de material de fácil limpieza;
- d) Según la tecnología existente podrán disponer de mesones de procedimientos de análisis, lisos, impermeables y resistentes a los ácidos, corrosivos y solventes, en una sola pieza y que no existan uniones o hendiduras;
- e) Abastecimiento de agua potable permanente;
- f) Alcantarillado conectado a la red pública o pozo séptico en caso de no existir alcantarillado.

**Art. 20.-** Los laboratorios clínicos dispondrán de ambientes independientes que garanticen funcionalidad y seguridad en las tres fases: pre-analítica, analítica y post-analítica. Dependiendo del tipo al que pertenecen y de las actividades que realizan.

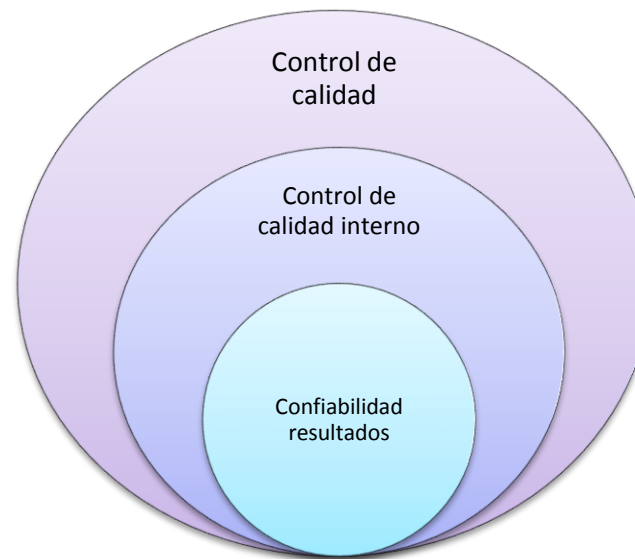
**Art. 21.-** Los laboratorios clínicos dispondrán de ambientes independientes que garanticen funcionalidad y seguridad en las tres fases: pre-analítica, analítica y post-analítica. Dependiendo del tipo al que pertenecen y de las actividades que realizan, tendrán las siguientes áreas debidamente rotuladas:

- a) Área de espera con baño: espacio amplio, con adecuada iluminación y ventilación, ubicado a la entrada del laboratorio; o puede compartir con el establecimiento de salud en el que se ubica.
- b) Área para toma de muestras generales y para toma de muestras especiales: existirá al menos un cubículo para la toma de muestras y el número de los mismos estará acorde a la demanda de pacientes. Dependiendo del nivel de atención, el área de toma de muestras tendrá un espacio para camilla destinado a toma de muestras especiales.
- c) Área administrativa: está destinada a la jefatura del servicio. Cuando se requiera y en función de la demanda, esta área funcionará independientemente y podrá ser compartida con la secretaría y con el archivo.
- d) Área de análisis o procesamiento: es un espacio con acceso restringido que contará con una sección específica para la recepción y distribución de muestras. Para el procesamiento de las muestras, cada sección de trabajo estará bien definida, exceptuando microbiología, anatomía patológica y biología molecular, que contarán con ambientes diferenciados.
- e) Área de soporte o utilerías para garantizar las condiciones de almacenamiento que asegure la estabilidad de los materiales a ser utilizados. Tendrá las siguientes secciones:
- f) Área de almacenamiento para manejo diferenciado de desechos comunes e infecciosos, de conformidad a la normativa vigente. Esta área será compartida, si está en una Unidad Operativa de Salud.
- g) Área de vestidores con facilidades para que el personal utilice las prendas de protección laboral.
- h) Área de descanso para el equipo de salud, en aquellos servicios de 24 horas.

### 2.3. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES



Variable independiente



Variable dependiente

## 2.4. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.4.1. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Un análisis se define en identificar los componentes de un todo, separarlos y examinarlos para lograr llegar a sus principios más elementales. Por lo tanto un análisis de muestra son pruebas que permiten desarrollar un diagnóstico a través del conjunto de instrucciones que describen el procedimiento, los materiales y el equipamiento necesarios para que el analista pueda obtener resultados. A través de métodos que tienen como objetivo la exploración complementaria de las muestras que permita al médico confirmar o descartar un diagnóstico de muestras biológicas que puede aportar con un resultado objetivo ya sea cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo.

- a. Métodos cualitativos:** son aquellos en los que se pretende detectar la existencia o ausencia de un microorganismo determinado, claramente especificado, en una porción de sustancia (muestra).
- b. Métodos cuantitativos:** son aquellos en los que se desea indicar el número de unidades formadoras de colonia en una cantidad de sustancia, realizando un recuento concreto. Su objetivo es detectar un valor numérico de un agente infeccioso en una muestra.
- c. Métodos semi-cuantitativos:** son aquellos en los que se indica el número de microorganismos en una cantidad de muestra determinada, teniendo en cuenta la estadística, se trata de métodos en los que el número de microorganismos por cantidad de muestra determinada se obtiene a través de unas tablas estadísticas, cuyo valor está incluido en un intervalo de confianza (SEIMC 2013).

### 2.4.2. FASES DEL ANÁLISIS CLÍNICO

El proceso de realización de un análisis microbiológico se puede dividir en tres fases: preanalítica (petición de la prueba, procesamiento de la petición, recogida y transporte de la muestra y recepción y registro de la muestra en el laboratorio),

analítica (preparación y realización de la prueba y obtención de los resultados) y postanalítica (informe de los resultados, interpretación de los mismos, autorización para entrega de los resultados). El proceso se considera cerrado hasta que el médico petionario recibe el resultado del análisis que solicitó.

#### **2.4.2.1. Fase post-analítica**

Esta fase implica la validación global del informe analítico completo donde se deben hacer observaciones o llamados de atención, hasta la distribución de informes y el almacenamiento de los datos.

#### **2.4.2.2. Fase analítica**

Incluye procedimientos puramente técnicos a los que es sometida la muestra, incluyendo control de calidad. El laboratorio debe utilizar procedimientos apropiados con eficacia demostrada para realizar los ensayos.

### **2.4.3. FASE PREANALÍTICA**

Procedimiento que empieza en el momento de la solicitud por parte del médico e incluye la toma de la muestra, su transporte y conservación, recepción de la toma de muestra en el laboratorio y registro de los datos de la misma. Termina cuando comienza el procedimiento analítico. Las etapas que forman parte de esta fase son:

#### **2.4.3.1. Solicitud de análisis por parte del Clínico (hoja de petición)**

La petición es el comienzo del proceso del laboratorio y la acción mediante la cual se provee al laboratorio de la información necesaria para llevar a cabo su trabajo.

Es imprescindible que en la solicitud se encuentren los siguientes datos:

- Identificación del paciente.
- Información clínica relevante.



- Motivo de la petición.
- Paciente tiene o no antibioterapia.
- Tipo de muestra.
- Fecha y hora de la recogida de la muestra.
- Método de obtención.
- Médico solicitante.
- Pruebas o estudios solicitados.
- Información adicional.

#### **2.4.3.2. Obtención de las muestras**

Los profesionales encargados de la toma de muestras dispondrán de un manual de extracción, toma, transporte de muestras y contenedores adecuados. Área de extracciones y toma de muestras, sala de espera para los pacientes y servicios de higiene correspondientes. Mientras que los horarios de extracciones y recogida de muestras deben ser acorde a sus características (Gegmic A. 2004).

#### **2.4.3.3. Transporte de muestras**

Las muestras para un estudio microbiológico y medios de cultivos deben ser transportados inmediatamente al laboratorio evitando una agitación vigorosa. La incubación de los medios deben ser incubados en aerobiosis y anaerobiosis a una temperatura de 36 °C por un período máximo de 7 días.

Una vez realizada la extracción, los especímenes deben ser organizados por códigos, además asegurar que los especímenes estén identificados, se centrifugan (si es posible) y se envían en gradillas, de forma ordenada según códigos de barras y tipo de tubo, en posición vertical para evitar interferencias. Algunos tipos de muestras especialmente sensibles es posible que necesiten sistemas de refrigeración y recipientes que los protejan de la luz, etc. (López J. 2007).

#### **2.4.3.4. Aceptación y rechazo de muestras**

El laboratorio debe disponer de un documento donde refleje su sistemática de trabajo en el área de recepción de muestras y su normativa sobre aceptación y rechazo de muestras. En el punto de extracción se elaborará un registro diario de recogida y transporte de muestras en el que estén relacionados los contenedores.

El registro incluirá si la muestra cumple con los criterios de aceptabilidad como volúmenes requeridos, conservación, hora de recogida de muestra etc. Además del nombre de la persona que ha preparado el envío si lo hubiere, la hora en que se recoge y quién realiza el transporte, etc.

#### **2.4.3.5. Conservación de las muestras tras su procesamiento**

Mantener todas las muestras (procesadas y rechazadas) a temperatura ambiente, refrigeradas o congeladas, según los protocolos, durante un tiempo que garantice que un problema en el procesamiento o en la interpretación de los resultados obtenidos pueda ser solucionado recuperando la muestra para un nuevo procesamiento normalmente entre 1 y 3 días (Gegmic A. 2004).

#### **2.4.3.6. Preparación de los medios**

La preparación adecuada de un medio de cultivo nos permite disponer de los nutrientes y condiciones adecuadas para favorecer el crecimiento de los microorganismos del laboratorio.

#### **En la recepción**

- Se debe comprobar la fecha de caducidad.
- Indicar la fecha de recepción.
- Almacenarlo en condiciones adecuadas.

### **Al utilizarlos**

Conservarlos los recipientes en un lugar adecuado.

Verificar la fecha de caducidad y llevar registros de preparación del medio.

Verificar que los recipientes estén herméticamente sellados (Gómez, K. 2013).

### **Antes del procedimiento se debe tomar en cuenta:**

- Leer cuidadosamente las instrucciones de preparación del medio.
- Pesar la cantidad exacta del medio deshidratado o las porciones correctas.
- Cerrar inmediatamente el frasco del medio.
- Disolver la porción pesada de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Tener cuidado de no sobrecalentar el medio.
- Ajustar el pH final de cada lote de medio preparado. Para ello se debe tomar una alícuota de 50 mL, medir el pH.
- Distribuir el medio. Tratando de transferir a cada caja 25 mL que sobrepase a 4 mm de espesor.
- Identificar el lote adecuado y conservarlo en condiciones adecuadas.

### **2.4.2. CONTROL DE CALIDAD**

Es el conjunto de técnicas y actividades de carácter operativo, utilizadas para verificar los requisitos relativos a la calidad del producto o servicio (Fernández, L. 2012).

#### **2.4.2.1. Control de calidad en el área de microbiología**

Es sistema diseñado para incrementar la probabilidad de que cada resultado reportado de por el laboratorio sea válido y pueda ser utilizado con confianza por el médico para tomar una decisión diagnóstica o terapéutica.

### **a) Personal**

Como norma general es conveniente seguir estos principios:

- Se debe identificar en cada laboratorio un supervisor para el control de calidad.
- El personal de laboratorio es responsable de llenar los registros de control de calidad en los formatos apropiados que han sido facilitados por el supervisor.
- El supervisor es responsable de la revisión mensual de los datos generados por el control de calidad interno.
- El supervisor es responsable de mantener los registros de una forma organizada que facilite el acceso y la inspección de los mismos.
- Los registros deben guardarse durante un periodo mínimo de 2 años.

### **b) Condiciones Ambientales**

Las condiciones ambientales requeridas para desarrollar los ensayos relacionados con el control específico de medios y reactivos.

### **c) Manuales de Procedimientos**

- Cualquier técnica realizada en el laboratorio debe tener su manual de procedimiento que tiene que estar disponible de forma permanente.
- Los procedimientos deben indicar: componentes del medio/reactivo y su proporción, modo de preparación, envasado e identificación, controles que deben realizarse y criterios de aceptabilidad, plan y frecuencia del control, condiciones de conservación y caducidad.
- Las modificaciones de los procedimientos o la inclusión de nuevos protocolos tienen que ser autorizados por el Supervisor de Laboratorio.

#### **d) Documento técnico de utilización**

Debe existir un documento o ficha que describa el reactivo, tanto para los preparados en el laboratorio como para los comerciales. Debe incluir:

- Descripción: componentes y su proporción
- Indicación: para que reacción o ensayo microbiológico está indicado.
- Controles: qué controles deben usarse y criterios de aceptabilidad.
- Plan y frecuencia de control.
- Condiciones de conservación.
- Limitaciones de su uso o de interpretación.
- Descripción del tipo de lectura de los resultados y método de lectura.

#### **e) Etiquetado**

Los lotes de reactivo deben estar etiquetados indicando la identidad, concentración en el caso de reactivo preparados en el laboratorio, temperatura de conservación, fecha de preparación o de apertura del envase en reactivos listos para su uso y fecha de caducidad validada y/o períodos de almacenamiento.

### **2.4.2.2. Control de calidad en equipos**

#### **a) Incubadoras:**

Se controlará diariamente la temperatura de las incubadoras, antes de sacar las placas y se anotará en una hoja control el resultado.

Coloque las muestras, placas y tubos, en una posición segura.

Un papel de filtro humedecido con agua en el fondo de la incubadora, es adecuado para mantener la humedad requerida.

Observe macroscópicamente las placas Petri para observar desecación.

Todas las incubadoras deben ser limpiadas mensualmente y llevar un récord de mantenimiento preventivo.

**b) Autoclave:**

Frecuencia: diaria, deber ser anotado en un registro.

Examine récord de Temperatura y Presión.

Utilice Indicadores químicos y biológicos de Esterilización.

Récord de uso, fecha, temperaturas, presión.

Chequeo del nivel de agua.

Limpieza del Interior y Exterior.

Limpieza de la Pantalla de Temperatura.

Limpieza del drenaje y sellos.

**c) Refrigeradoras:**

Frecuencia: diaria, deber ser anotado en un registro.

Coloque las placas Petri en posición invertida con la tapa hacia abajo.

Mantenga la temperatura entre 4 – 8 ° C.

Utilice refrigeradoras que no hacen escarcha.

No coloque medios de cultivo aún ligeramente calientes dentro de la refrigeradora.

Evite abrir con frecuencia la puerta de la refrigeradora.

Lleve un registro de problemas de funcionamiento, causa y solución.

**d) Microscopios:**

Frecuencia: ser diario, mensual o semestral, deber ser anotado en un registro.

Limpieza del aceite de objetivos, condensador, etc.

Colocar cobertor contra el polvo.

Limpieza de Ocular, condensador, diafragma con líquido de limpieza de lentes.

Limpieza y ajuste del sistema óptico.

Limpieza y ajuste del sistema lumínico.

Limpieza y lubricación del sistema mecánico (Villamar C. 2009).

**TABLA No 1.** Control de equipo y sus mediciones

Equipo	Procedimiento	Período	L. de tolerancia	Precauciones
Refrigerador 4 °C	Registro de temperatura	Diario	± 1 °C	Limpieza mensual
Incubadoras 37 °C	Registro de temperatura	Diario	± 1 °C	Limpieza mensual
Incubadora con CO <sub>2</sub>	Registro de temperatura	Diario	36-38 °C 5.10% CO <sub>2</sub>	Limpieza mensual
Autoclave	Controles biológicos	Diario	No crecimiento	Limpieza cada vez que se usa
Microscopio	Limpieza	Cada vez que se use	---	Revisión general cada 6 meses
Centrifuga	Comprobar rpm	Cada 6 meses	---	Revisión general cada 12 meses
Cabinas de seguridad	Registro de flujo de aire y luz UV	Diario	---	Cambio de filtros cada 3000 horas

**Fuente:** (Sáenz, C. 2005).

### 2.4.3. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Es un proceso estadístico usado para monitorear y evaluar el proceso analítico que proporcione resultados de pacientes. Es un análisis de una o más muestras de valores conocidos, utilizados al mismo tiempo con las muestras de los pacientes.

#### 2.4.3.1. Clases de controles de calidad:

- **Control normal:** contiene niveles comprometidos entre los valores de referencia del analito que se va a determinar.
- **Controles anormales:** contienen el analito a una concentración mayor o menor del rango considerado como referencia para ese analito.
- **Control de las condiciones de trabajo:** se refiere a la esterilidad de los medios y materiales, sobre la buena práctica en la realización de los ensayos.

#### 2.4.3.2. Ensayos cuantitativos:

- **Control de la precisión:** muestras naturales sin inocular y/o muestras naturales inoculadas.
- **Control de recuperación:** muestras inoculadas con materiales de referencia o cepas de referencia o a partir de resultados de interlaboratorios.

#### **2.4.3.3. Ensayos cualitativos:**

El control de calidad interno debe incluir actividades que garanticen un adecuado control del método a niveles bajos de contaminación. Estas actividades de control de calidad deben realizarse si es posible con muestras naturales tanto positivas (inoculadas o contaminadas naturalmente) y negativas (Mostorino, R. 2005).

#### **2.4.3.4. Medios de cultivo**

Los medios de cultivo deben ser sometidos a un control de calidad interno que asegure esterilidad, permiten y/o inhiben el crecimiento de microorganismos.

##### **a) Medios de cultivo comerciales**

En cada envío, el fabricante debe aportar información sobre: el nombre del medio, número de lote, cantidad enviada, fecha de caducidad, un certificado del control de calidad en el que se especifican las condiciones de conservación, control de esterilidad, criterios de aceptabilidad, control del funcionamiento indicando las cepas utilizadas, fecha de emisión y firma del responsable del laboratorio fabricante. Antes de introducir un nuevo medio en el laboratorio debe ser validado con cepas de referencia, además de comprobar las características físicas (color, placas rotas, excesivo número de burbujas, crecimiento de colonias, etc.), esterilidad y la comprobación del crecimiento de microorganismos.

##### **b) Medios de cultivo preparados en el laboratorio.**

En este caso, hay que controlar el medio deshidratado, los aditivos que se van a utilizar, el procedimiento de la elaboración, el envasado, etiquetado y almacenamiento y por último, comprobar las características físicas, esterilidad y funcionamiento del medio preparado con cepas de referencia. El proceso de elaboración debe quedar registrado, anotando la identidad de los medios,



número de lote o fecha de preparación, condiciones de almacenamiento, fecha de caducidad y la identidad de la persona que los ha preparado.

**TABLA No 2.** Control de calidad de los medios

Medio	Organismo	Reacción esperada
Agar sangre	<i>Streptococcus del grupo A</i>	Buen crecimiento $\beta$ hemolítico
	<i>S. pneumoniae</i>	Buen crecimiento $\alpha$ hemolítico
Agar Chocolate	<i>Haemophilus influenzae</i>	Buen crecimiento
Agar Mueller-Hinton	<i>E. coli</i>	Buen crecimiento
Agar Mac-Conkey	<i>E. coli</i>	Colonias rosadas
Agar Urea	<i>E. coli</i>	Amarillo (negativo)
Agar Citrato	<i>E. coli</i>	No crecimiento permanece verde (negativo)
Agar Cistina tripticasa	<i>N. gonorrhoeae</i>	Amarillo (positivo)
Descarboxilasas lisina	<i>K. pneumoniae</i>	Azul (positivo)
Indol	<i>E. coli</i>	Rojo (positivo)
Malonato	<i>E. coli</i>	Sin crecimiento
Agar movilidad	<i>K. pneumoniae</i>	Sin bordes
Agar <i>salmonella-shigella</i>	<i>S. typhimurium</i>	Colonias sin color, centros negros
	<i>E. coli</i>	No crecimiento

Fuente: (Bailey, Scott. 2001)

#### 2.4.3.5. Reactivos:

Se consideran como tales, los colorantes para tinciones, discos con reactivos o con antimicrobianos, y los kits o sistemas comerciales que incorporan una variedad de medios, sustancias bioquímicas y reactivos. Todos los reactivos deben estar etiquetados con su contenido, concentración, condiciones de conservación, fecha de preparación, y fecha de caducidad o período recomendado de almacenamiento, y un control de todos los reactivos utilizando cepas de referencia.

#### 2.4.3.6. Material de referencia

##### a) Cepas de referencia

Las cepas de referencia o cepas patrón se definen como microorganismos procedentes de un cultivo puro, definidos por lo menos al nivel de género y especie,

catalogados y descritos según sus características y preferiblemente de origen conocido.

#### **b) Cepas de reserva**

Se obtienen por subcultivo en los medios adecuados de las cepas de referencia. Las cepas de reserva se pueden conservar mediante liofilización, en nitrógeno líquido o congeladas a temperaturas  $\leq -50^{\circ}\text{C}$  en medios con agentes estabilizantes para la congelación. En estas condiciones pueden mantenerse indefinidamente y a temperaturas entre  $-50^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  se pueden conservar hasta un año.

#### **c) Cepas de trabajo**

Se obtienen por subcultivo de las cepas de reserva, una vez descongeladas, en medios sólidos seleccionados según el microorganismo. Se conservan a  $2-8^{\circ}\text{C}$  o a temperatura ambiente durante un máximo de un mes, siempre que se asegure la viabilidad de la cepa. De las cepas de trabajo se pueden realizar como máximo tres subcultivos, siempre que la cepa conserve sus características. Las cepas de trabajo no se deben subcultivar para sustituir a las cepas de reserva. (SEIMC 2013)

### **2.4.4. CONFIABILIDAD DE LOS RESULTADOS**

Confiabilidad es un término que hace referencia habitualmente a la estabilidad de la medida cuando ésta se repite varias veces.

A través de las pruebas de control de calidad para confirmar la precisión de sus sistemas de prueba, es la principal manera de tener confianza en que los resultados de los pacientes sean correctos (Araujo E. 2008).

#### **2.4.4.1. Consideraciones para el control de calidad de los medios reconstituidos**

Cada lote de medio preparado, partiendo de los ingredientes individuales, o cada número de lote diferente de medio deshidratado de un fabricante debe ser probado

para la esterilidad, la habilidad para soportar el crecimiento de organismo(s) específicos y la habilidad para producir reacciones bioquímicas de manera apropiada.

**a) Esterilidad**

Incube toda la noche a 35°C–37°C un tubo o una placa por cada lote de medio esterilizado. Durante 48h a la T° a la que va a ser incubado en el uso con muestra clínicas y posteriormante otras 48 h a T<sup>a</sup> ambiente.

**b) Control de pH:**

Se controlará el pH del medio en cada lote de preparación, teniendo como rango de 7.2 a 7.4 después de gelificar a temperatura ambiente.

**c) Profundidad del agar**

El estándar es de 4 mm. Se utilizará un vernier o una aguja con la marca de la medida y probar en cuatro cuadrantes y el centro de la placa (Gómez, K.).

60 – 70 ml de agar para placa de 150 mm.

25 – 35 ml de agar para placas de 100 mm.

**Procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos se los considera en:**

**Categoría I:** pruebas cuantitativas del contenido del principio activo, son procedimientos químicos o microbiológicos que miden el analito presente en una muestra determinada.

**TABLA No 3.** Parámetros de desempeño para categorías I de prueba

Parámetro	Categoría I /Principio activo
Exactitud	SI
Precisión	SI
Especificidad	SI
Límite de detección	NO
Límite de cuantificación	NO
Linealidad	SI
Intervalo	SI

**Fuente:** (Arriola, L. 2012)

#### 2.4.4.2. Precisión de un ensayo

Es el grado de concordancia entre los resultados independientes de una medición, obtenidos en condiciones estipuladas, ya sea de repetibilidad o de reproducibilidad y depende de la distribución de los resultados sin estar relacionada con el valor verdadero. Mediante el control interno, que es estimado por la repetibilidad y reproducibilidad.

- **Repetibilidad:** Realización de los ensayos en las mismas condiciones (mismo analista, equipos, medios de cultivo).
- **Reproducibilidad:** Realización de los ensayos en las condiciones más diversas (distinto analista, equipos, días, medios de cultivo).

Para determinar la precisión, se trabaja con submuestras de una muestra homogénea, bajo las mismas condiciones medición. Hacer un mínimo de 9 determinaciones: 3 réplicas a 3 concentraciones diferentes o 9 determinaciones al 100% de la concentración normal de trabajo.

**DESVIACIÓN ESTÁNDAR:** Es la medida de cómo se dispersan los valores alrededor de la media en la distribución de valores. Se calcula con la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=0}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}$$

En donde: n es el número de valores.

**DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (RSD):** Es la comparación de la desviación estándar con respecto a la media, generalmente se expresa en % y se denomina como Coeficiente de Variación. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

En donde:  $s$  es la desviación estándar.

$\bar{x}$  es el promedio de las mediciones.

La precisión de un método microbiológico habitualmente se expresa como desviación estándar o coeficiente de variación. La desviación estándar relativa esperada en función UFC/Placa es la siguiente:

**TABLA No 4.** Desviaciones estándar relativas en función a las UFC en placas

UFC/Placa	Desviación estándar relativa
<b>30-300</b>	<15%
<b>10-30</b>	<25%
<b>&lt;10</b>	<35%

Fuente: (USP 30, 2007)

## 2.5. HIPÓTESIS

**H1:** La fase preanalítica influye en la confiabilidad de los resultados en el área de microbiología del laboratorio clínico “Ambalab”.

## 2.6. SEÑALAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

### Variable independiente

Fase preanalítica

### Variable dependiente

Confiabilidad de los resultados

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo tiene un enfoque cuantitativo porque vamos a trabajar con un número determinado de muestras que en las mismas se les cuantifican para saber la concentración de las mismas y así conocer los resultados a través de cuadros estadísticos para determinar la frecuencia con la que se presentan dichos microorganismos.

También tiene un enfoque cualitativo ya que con los debidos procedimientos se establecerá las características morfológicas de los patógenos cultivados verificando la confiabilidad de los resultados y las distintas medidas preventivas.

#### 3.2. MODALIDAD BÁSICA DE LA INVESTIGACIÓN

**Campo:** porque se desarrollará en el mismo laboratorio ya que es el lugar donde se recogerá las muestras y se realizará los debidos procedimientos tanto para la determinación microbiológica como la observación de los parámetros de la fase preanalítica para la rehidratación de los medios, que pueden influir en la calidad de los resultados.

**Bibliográfica:** porque para la presente investigación se ha tomado una serie de documentos que fundamenten con argumentos verdaderos la presente investigación y basados en ellos dar un soporte científico a los resultados y comprobación de la hipótesis.

### 3.3. NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN

**Descriptiva:** porque es necesario la práctica de control de calidad en el área de microbiología por ello se buscará conocer los factores de riesgo que influyen en los resultados además de identificar las medidas de protección y control de calidad que ponen en práctica el personal del establecimiento y de no ponerlos en práctica, las consecuencias que se pueden producir tanto en las muestras como en el personal.

**Exploratorio:** porque identificaremos mediante un procedimiento establecido y una serie de pruebas microbiológicas, identificar las medidas preventivas que se toma en cuenta en la elaboración de los medios como los parámetros que influyen antes de la reconstitución de los mismos y su conservación.

**Explicativa:** porque después de los procedimientos para la identificación se realizará procesos estadísticos que permitan evaluar el procedimiento actual que se está llevando a cabo dentro del área, la relación de la calidad de los resultados y las medidas de bioseguridad que ponen en práctica.

### 3.4. POBLACIÓN Y MUESTRA

Como la población es finita se tomará como muestra todo el universo.

Se utilizó 10 lotes de 23 cajas Petri cada uno correspondiente a Agar Sangre, Mac-Conkey, Sabouraud y Mueller-Hinton dando un total de 920 cajas Petri de las cuales se tomó una muestra de cada lote que correspondió a 3 cajas Petri dando un total de 120 cajas Petri utilizadas tanto para el estudio de esterilidad y pH, mientras que en el estudio con la cepa control de los medios de cultivo para las tres diluciones diferentes se realizó con 2 lotes de 10 cajas Petri de los 4 medios de cultivo que corresponde a 240 cajas con total de 360 cajas Petri utilizadas en todo el estudio.

### 3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

#### 3.5.1. Variable independiente: Fase preanalítica

Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas	Instrumento
Conjunto de operaciones que se realizan desde que se recibe la petición analítica hasta que se inicia la fase analítica	<p><b>Análisis ambiental del área</b>  <b>Hongos</b>  <b>Bacterias</b></p> <p><b>Esterilidad de autoclave</b></p> <p><b>Incubadora</b></p>	<p>&lt;0,1 UFC/m<sup>3</sup>            &lt;100 UFC/m<sup>3</sup></p> <p>Cinta testigo positiva            Cinta testigo negativa</p> <p>37±1 °C</p>	<p>¿El área de trabajo cumple con los valores aceptables de contaminación?</p> <p>¿El autoclave cumple con los niveles de desinfección?</p> <p>¿La incubadora cumple con los niveles adecuados de temperatura?</p>	Cultivos y pruebas microbiológicas	Hoja de registros

Elaborado por: Pamela Acosta



**3.5.2. Variable dependiente:** Confiabilidad de los resultados

Conceptualización	Dimensiones	Indicadores	Ítems Básicos	Técnicas	Instrumentos
El concepto de confiabilidad hace referencia a la estabilidad de los resultados.	<p><b>pH</b></p> <p><b>Profundidad</b></p> <p><b>Esterilidad</b></p> <p><b>Producción</b></p> <p><b>Coefficiente de variación de precisión</b></p> <p>30-300 UFC</p> <p>10-30 UFC</p> <p>&lt;10 UFC</p>	<p>7,2-7,4</p> <p>4mm</p> <p>Ausencia -presencia</p> <p>Numero de UFC</p> <p>&lt;15%</p> <p>&lt;25%</p> <p>&lt;35%</p>	<p>¿Cumplen con las condiciones que un medio de cultivo deben poseer?</p>	<p>Cultivos y pruebas microbiológicas</p> <p>Siembra por incorporación por SEIMC</p>	<p>Hoja de registros</p>

**Elaborado por:** Pamela Acosta

### **3.6. RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN**

Para la realización de la investigación primero se recolectó la información para la evaluación de los parámetros que entran en el procesamiento tanto de los medios como para el de la cepa. Después procedió con la evaluación tanto de los equipos y como del área de trabajo días antes del procesamiento de las cepas.

Posteriormente para medir la precisión tanto del método como de los medios de cultivos, se realizó la evaluación tanto de Agar Sangre, Mac-Conkey, Sabouraud y Mueller-Hinton, a través de la cepa control *E. coli* ATCC 11775 por un día se hicieron 10 repeticiones de cada medio de cultivo para establecer resultados y después, de dos días se realizó el mismo procedimiento y se establecieron resultados.

### **3.7. INFORMACIÓN DE LABORATORIO**

El estudio fue realizado primero en área de trabajo, para el área de trabajo se lo realizó a través del Agar Sabouraud y las placas Petrifilm para recuentos de aerobios y verificar que la desinfección sea eficaz, mientras tanto para la incubadora se utilizó con el termohigrómetro por dos días a través de lecturas programadas cada media hora este dispositivo, permitió obtener un promedio de las lecturas para determinar con que temperatura real está trabajando el equipo mientras que en el autoclave se verificó si llega a las temperaturas óptimas para esterilizar a través de cinta testigo.

Mientras que para el control de calidad de los medios se realizaron a partir de diferentes controles en los que constan: un control macroscópico, un control de pH, un control de esterilidad y un control de los medios que se hizo a través de la cepa control *E. coli* ATCC 11775 a través de siembra por incorporación de diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , etc. ) a partir de esta cepa en un día determinado 10 repeticiones de cada uno de los medios así medimos la repetibilidad de los ensayos y después de 2 días se realizó el mismo procedimiento bajo las mismas condiciones por otro analista para determinar la reproducibilidad y así establecer resultados.

### **3.8. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS**

Todos los datos recopilados, para su tabulación, fueron tomados en cuenta en la “matriz de datos” con alternativas que forman parte del procesamiento de los medios es decir la fase preanalítica, con la finalidad de obtener análisis estadísticos de los resultados de cada muestra. Para su posterior análisis y discusión se realizó cuadros y gráficas de los datos obtenidos se utilizó en el programa SPSS; mientras que para determinar la relación entre la fase preanalítica y la confiabilidad de los resultados se realizó en el Programa Matemático Microsoft Excel 2010).

#### **3.8.1. Materiales**

- Asas de platinos
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Lámparas de alcohol
- Gradilla
- Hisopos estériles
- Puntas amarillas estériles.
- Reloj de laboratorio
- Desinfectante
- Par de guantes quirúrgicos
- Mascarilla
- Toca
- Mandil
- Placas
- Tubos
- Cinta testigo
- Criovial
- Matraz
- Papel aluminio

#### **3.8.2. Equipos**

- Microscopios OLYMPUS CORPORATION
- Incubador marca MEMMERT
- Pipeta electrónica 3M
- Termohigrómetro digital marca HOBO
- Autoclave modelo 120 VOLTS ALL AMERICAN
- Refrigerador INNOVA
- Balanza ZELIAN
- Peachimetro METTLER TOLEDO

### **3.8.3. Reactivos**

- Reactivos para tinción Gram
- Peróxido de hidrógeno
- Aceite de inmersión
- Cepa control ATCC
- Agar Sangre
- Agar Mac-Conkey
- Agar Sabouraud
- Agar Mueller-Hinton
- Pruebas bioquímicas
- Agua peptona
- Agua destilada
- Placas petrifilm para aerobios totales

### **3.8.4. PROCEDIMIENTO**

#### **Procedimiento de preparación, equipos e instrumental**

##### **Incubadora**

- Se monitoreó la temperatura a través del aplicativo termohigrómetro dentro de la estufa.
- Se evitó abrir innecesariamente.
- Las lecturas fueron realizadas cada media hora.
- Se colocó el termohigrómetro las 13:11 del día viernes 04/04/2014 hasta el día domingo 06/04/2014 a las 7:41 de la mañana.
- Con el rango de lecturas se estableció un promedio dando un valor más acertado al cual está trabajando la estufa.

##### **Monitoreo ambiental del área de trabajo**

- Se utilizó 6 cajas sabouraud y 6 placas petrifilm
- Se colocó las 3 cajas de sabouraud y las 3 placas petrifilm expuestas alrededor del espacio que se trabaja antes de la desinfección de rutina. El mismo que abarcó lo que el mechero cubre que es 50 cm de radio.
- Las cajas fueron expuestas por 15 min.

- Después se desinfectó el área de trabajo con alcohol 90% y fueron colocadas las otras 3 cajas de saboraud y 3 de las placas petrifilm expuestas alrededor del espacio que se trabaja.
- Las cajas fueron expuestas por 15 minutos.
- Posteriormente se incubaron las placas Petrifilm por 37°C por 48H y las cajas de Agar Sabouraud a 25°C por 5 días.
- Posteriormente se estableció los resultados (Cuesta, A. 2012).

### **Autoclave**

- Se utilizó como indicador la cinta testigo para verificar la esterilización del autoclave.
- Se colocó las cintas en los medios por cada lote que fue preparado.
- La verificación del buen funcionamiento es el viraje de color carmel a negro.

#### **a) Activación de la cepa control (KWIK-STIK™ Plus).**

1. Se sacó la unidad KWIK-STIK™ del almacenamiento a 2°C a 8°C y se permitió que la bolsa cerrada alcance temperatura ambiente.
2. Se abrió la bolsa y se sacó la unidad KWIK-STIK™.
3. Se liberó el líquido hidratante, pellizcando la ampolla de la tapa del equipo para romperla. Se permitió que el líquido hidratante fluya por el tallo del hisopo a la parte inferior de la unidad, donde está la pastilla de gelatina.
4. Se pellizó la parte inferior de la unidad para triturar la pastilla y se mezcló en el líquido, hasta que las partículas de la pastilla tengan un tamaño uniforme y la suspensión tenga un aspecto homogéneo.
5. Se saturó inmediatamente el hisopo con el material hidratado y se transfirió el material a un medio apropiado no selectivo. Se usó el mismo hisopo estéril para rayar y se hizo surcos repetidamente (unas 10 a 20 veces) en el área inoculada y luego se siguió rayando el resto de la superficie del agar.
6. Se incubó inmediatamente el medio inoculado con la temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo (Microbiologics. 2007).

### **a) Estándar de turbidez para preparación del inóculo**

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utilizó estándar de turbidez de BaSO<sub>4</sub>, equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. Un estándar de 0.5 McFarland de BaSO<sub>4</sub> se preparó como sigue:

1. Se tomó una alícuota de 0,5 mL de 0,048 m/L de BaCl<sub>2</sub> (1,175% p/v BaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O) se agregó a 99,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,18 mol/L (1% v/v) con agitación constante para mantener la suspensión.
2. La densidad correcta del estándar de turbidez se verificó usando un espectrofotómetro para determinar la absorbancia. La absorbancia a 625 nm fue de 0,08 a 0,10 para el estándar de 0,5 McFarland.
3. La suspensión de Sulfato de Bario se transfirió en alícuotas de 4 a 6 mL a unos tubos del mismo tamaño que aquellos que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias.
4. Este tubo fue bien sellado y almacenado en la oscuridad a temperatura ambiente.

### **b) Preparación del inóculo**

1. Se tomó del cultivo a partir de cepa KWIK-STIK™ Plus™ al menos 1 a 2 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología bien seleccionadas de un medio de cultivo. Se tocó la colonia por arriba con un asa y el crecimiento se transfirió a un tubo con 4 a 5 mL solución salina al 0,85%.
2. La mezcla de cultivo se incubó a 37°C hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar de 0.5 McFarland (usualmente 2 a 6 horas). Esto resultó en una suspensión que contiene aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UCF/mL.
3. Para realizarlo de mejor manera se realizó usando un espectrofotómetro o, si se hace visualmente debe tener luz adecuada para comparar el inóculo (Prat, S.).

## **Estudio de medios de cultivos**

### **Preparación de agua peptona**

- Se preparó 1,5 g del polvo en 100 mL de agua. Se calentó hasta que se disuelva.

- Se esterilizó al 121°C durante, 15 minutos y 15 libras de presión.

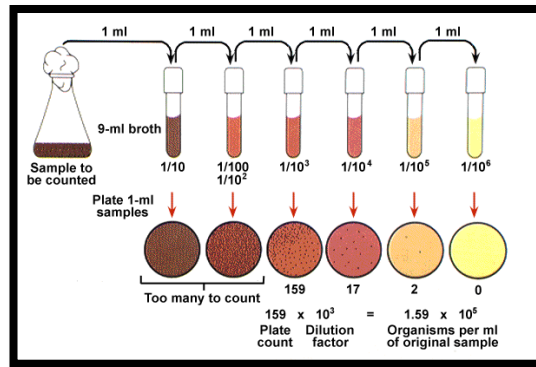
### **Pre-ensayo**

- A partir de la cepa control ATCC de *E. coli* en comparación a la escala 0,5 McFarland (método para determinar la concentración de una cepa de trabajo).
- Se realizaron 7 diluciones sucesivas de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  hasta  $10^{-7}$ .
- En los tubos se adicionó 9 mL de agua peptonada.
- En el primer tubo se adicionó 1mL de cepa control ATCC y se homogenizó.
- De la suspensión realizada anteriormente del primer tubo (dilución  $10^{-1}$ ) se tomó con una pipeta 1mL y se traspasó al segundo tubo (dilución  $10^{-2}$ ), del segundo al tercero y así hasta la séptima dilución.
- Después de cada dilución se tomó 1 mL, se colocó en la caja Petri y se procedió a añadir el Agar Sangre, Mac-Conkey, Mueller-Hinton y Sabouraud según corresponda y se mezcló bien. Este procedimiento se realizó por duplicado.
- Adicionalmente se realizó como control un estriamiento de la cepa en cada uno de los medios y un medio considerado como blanco.
- Se incubó los medios de cultivo a 37°C por 48H. Junto con placas en blanco de cada uno de los medios.
- Se procedió al recuento de las colonias a las 24H y posteriormente a las 48H.
- Se estableció a que dilución pudo realizarse un recuento del crecimiento de las colonias con el cual vamos a trabajar.

### **Ensayo**

- Se realizó diluciones de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ .
- Se realizó las siembras en el Agar Sangre, Mac-Conkey, Mueller-Hinton y Sabouraud según corresponda y se homogenizo bien.
- Esto se realizó 10 repeticiones de cada uno.
- Se incubó a 37°C por 48H. Junto con placas en blanco de los medios.
- Adicionalmente se sembró en las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Se procedió al recuento de las colonias a las 24H y posteriormente a las 48H.

El procedimiento fue realizado otro día por otro técnico para medir la reproducibilidad.



**GRÁFICO 1.** Diluciones por cuenta viable

**Fuente:** (Camacho, A. 2009).

### Análisis Interpretativo

A partir de un cultivo bacteriano la suspensión inicial (Patrón1-P1) de la cepa seleccionada y ajustada a una turbidez correspondió al patrón Mc-Farland 0,5; equivalente aproximadamente a  $1,5 \times 10^8$  bacterias/ml (ICONTEC, 2000). De este cultivo se preparó una dilución 1:10 (Patrón 2–P2) lo cual la población bacteriana equivalente a  $1,5 \times 10^7$  bacterias/ml.

2. A partir de P2 se preparó seis diluciones 1:10 para obtener los patrones P3, P4, P5, P6 y P7 con unas poblaciones aproximadas a  $1,5 \times 10^6$  bacterias/ml;  $1,5 \times 10^5$  bacterias/ml;  $1,5 \times 10^4$  bacterias/ml;  $1,5 \times 10^3$  bacterias/ml, respectivamente. De la siguiente manera (Cabeza, E. 2013).

**TABLA N 5.** Referencia de número de bacterias de los tubos patrones

Patrón de dilución	Población teórica	Número de colonias en el tubo	Número de colonia en 1 ml
<b>Tubo estándar <math>10^0</math></b>	$1,5 \times 10^8$	Incontable	Incontable
<b>P1 (<math>10^1</math>)</b>	$1,5 \times 10^7$	Incontable	Incontable
<b>P2 (<math>10^2</math>)</b>	$1,5 \times 10^6$	Incontable	Incontable
<b>P3 (<math>10^3</math>)</b>	$1,5 \times 10^5$	Incontable	Incontable
<b>P4 (<math>10^4</math>)</b>	$1,5 \times 10^4$	15000	1500
<b>P5 (<math>10^5</math>)</b>	$1,5 \times 10^3$	1500	150
<b>P6 (<math>10^6</math>)</b>	$1,5 \times 10^2$	150	15
<b>P7 (<math>10^7</math>)</b>	$1,5 \times 10^1$	15	1,5

**Fuente:** (Cabeza, E. 2013).



### **Agar Sangre**

- Se preparó 8.0 g del agar en 200 mL de agua destilada. Se mezcló bien y se calentó con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se autoclavó a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Se enfrió a 60°C.
- Se añadió el 5% de sangre estéril (añada 10 mL de sangre a 200 mL de agar).
- Posteriormente a una temperatura aproximada de 50°C y procedió a dispensar el agar en las cajas Petri que anteriormente contenían el 1mL de la dilución con la cepa control ATCC.

### **Agar Mac-Conkey (AMC)**

- Se preparó 10 g del agar en 200 mL de agua destilada. Se mezcló bien y se calentó con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se esterilizó el medio por autoclave a 121°C durante 15 minutos y a 15 libras de presión.
- Posteriormente a una temperatura aproximada de 50°C y procedió a dispensar el agar en las cajas Petri que anteriormente contenían el 1mL de la dilución con la cepa control ATCC.

### **Agar Mueller-Hinton**

- Se preparó 7,6 g del agar en 200 mL de agua destilada. Se mezcló bien y se calentó con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se autoclavó a 121°C durante 15 minutos y a 15 libras de presión. Se enfrió a 60°C.
- Posteriormente a una temperatura aproximada de 50°C y procedió a dispensar el agar en las cajas Petri que anteriormente contenían el 1mL de la dilución con la cepa control ATCC.

### **Agar Sabouraud con antibiótico**

- Se suspendió 6,5 g del medio en 200 mL de agua destilada. Se mezcló bien y se calentó con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se esterilizó en el autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

- Posteriormente a una temperatura aproximada de 50°C se añadió en el agar la ampollita de gentamicina con una concentración de 80mg.
- Se procedió a dispensar el agar en las cajas Petri que anteriormente contenían el 1mL de la dilución con la cepa control ATCC.

## **PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

### **TSI**

- Se preparó 7,6 g del agar TSI en 100 mL de agua destilada. Se mezcló bien y se calentó con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se depositó 3 mL en un tubo de ensayo.
- Después se introdujo los tubos al autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión).
- Se dejó que el medio se solidifique y se seque en forma inclinada; y se conservó los tubos a 4°C.

### **Citrato**

- Se preparó 2,4 g de agar Citrato en 100 mL de agua destilada. Se mezcló bien y se calentó con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se depositó 3 mL en un tubo de ensayo.
- Después se introdujo los tubos al autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión).
- Se dejó que el medio se solidifique y se seque en forma inclinada; y se conservó los tubos a 4°C.

### **SIM**

- Se preparó 3,6 g de agar SIM en 100 mL de agua destilada. Se mezcló bien y se calentó con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se depositó 4 mL en un tubo de ensayo.

- Después se metieron los tubos al autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión), se enfrió el medio.
- Se dejó que el medio se solidifique y se seque en posición vertical; y se conservó los tubos a 4°C.

## **UREA**

- Se preparó 29 g de urea en 150 mL de agua. Se calentó hasta que se disuelva.
- Se dejó reposar de 10 a 15 min.
- Se distribuyó 2 mL en un tubo de ensayo.
- Después se introdujeron los tubos al autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión), se enfrió el medio.
- Se conservó los tubos a 4°C.

## **FRESCO:**

- a) Se etiqueto 2 placas de portaobjetos con las numeraciones respectivas.
- b) Se adicionó una gota de solución salina en cada placa y con la ayuda del asa obtener de cada uno de los microorganismos una colonia la cual se mezcló con el suero fisiológico hasta que esté completamente diluida.
- c) Se cubrió cada placa con sus respectivas placas cubreobjetos.
- d) Se observó en el microscopio óptico con los lentes objetivos: 4,10 y 40x.
- e) Se anotó las observaciones con el lente de 40x.

## **TINCIÓN DE GRAM:**

- a) Se etiqueto las placas con las mismas numeraciones respectivas.
- b) Se adicionó una gota de suero fisiológico en cada placa y con la ayuda del asa obtener de cada uno de los microorganismos una colonia la cual se mezcló con suero fisiológico hasta que esté completamente diluida.
- c) Las placas fueron expuestas en la incubadora hasta que la muestra éste completamente seca.

- d) Primeramente se adicionó una cantidad suficiente de cristal violeta, se esperó 1 minuto y se enjuagó con agua destilada.
- e) Seguido se adicionó una cantidad suficiente de lugol, se esperó 1 minuto y se enjuagó con agua destilada.
- f) Se prosiguió a decolorar con alcohol o cetona, se esperó 30 segundos y se enjuagó con agua destilada.
- g) Por último se adicionó la safranina se esperó 1 minuto y se enjuagó con agua destilada.
- h) Se dejó que las placas se sequen al ambiente para proseguir con la observación.
- i) La observación fue realizada con el lente de 100 X, con la utilización del aceite de inmersión.
- j) Se anotó lo observado.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La investigación tiene como objetivo averiguar la influencia que tiene la fase preanalítica en un buen diagnóstico de los resultados del laboratorio clínico “Ambalab”, ya que la calidad con la que son realizados intervienen directamente en el diagnóstico y tratamiento.

En la investigación se toma en cuenta dos puntos:

1. Evaluación de parámetros previos a la preparación de los medios de cultivo.
2. Control de calidad de los medios.

#### 4.1. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

**TABLA No 6.** Ítems en la fase preanalítica de la preparación de los medios de cultivos.

Ítems	Cumplen	No cumplen
Registros de recepción de los medios	×	
Conservación del medio deshidratado	×	
Etiquetado de agares y reactivos	×	
Etiquetado de los equipos		×
Registro de control de medios de cultivos		×
Registro de control de los equipamientos		×
Manual del área de microbiología		×

**Elaborado por:** Pamela Acosta

**INTERPRETACIÓN:** Estos son parámetros que se consideraron que deben ser llevados de una manera adecuada en el área de microbiología pues dentro de los parámetros que cumplen están los registro de los lotes de medios de cultivos, conservación y etiquetado mientras que en los que no cumplen son etiquetado de equipos, los registros y el manual, ya que todos estos más que parámetros de control de calidad influyen también como

factores que guardan la integridad de los medios deshidratados, además de permitir realizar un análisis de la situación actual del área de trabajo a través de la observación del funcionamiento de los equipos en los registros y conjuntamente realizar un control durante el procedimiento de reconstitución de los medios de cultivo, tomando en cuenta las medidas preventivas que resguarden la integridad del medio ya que de no cumplirse estos parámetros pueden afectar los componentes de los medios deshidratados teniendo consecuencias en la recuperación del microorganismo y no tener la calidad de los resultados que necesitamos.

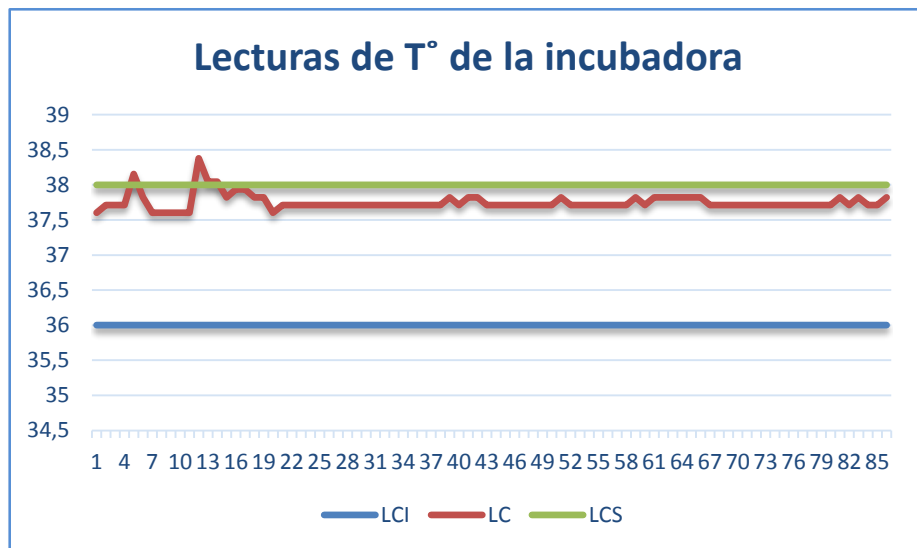
**TABLA No 7.** Lecturas de la temperatura de la incubadora, seteada a 37°C.

NÚMERO	FECHA/HORA	T°C	NÚMERO	FECHA/HORA	T°C
1	04/04/2014 13:11	37,604	45	04/05/2014 11:11	37,714
2	04/04/2014 13:41	37,714	46	04/05/2014 11:41	37,714
3	04/04/2014 14:11	37,714	47	04/05/2014 12:11	37,714
4	04/04/2014 14:41	37,714	48	04/05/2014 12:41	37,714
5	04/04/2014 15:11	38,157	49	04/05/2014 13:11	37,714
6	04/04/2014 15:41	37,824	45	04/05/2014 11:11	37,714
7	04/04/2014 16:11	37,604	50	04/05/2014 13:41	37,714
8	04/04/2014 16:41	37,604	51	04/05/2014 14:11	37,824
9	04/04/2014 17:11	37,604	52	04/05/2014 14:41	37,714
10	04/04/2014 17:41	37,604	53	04/05/2014 15:11	37,714
11	04/04/2014 18:11	37,604	54	04/05/2014 15:41	37,714
12	04/04/2014 18:41	38,379	55	04/05/2014 16:11	37,714
13	04/04/2014 19:11	38,046	56	04/05/2014 16:41	37,714
14	04/04/2014 19:41	38,046	57	04/05/2014 17:11	37,714
15	04/04/2014 20:11	37,824	58	04/05/2014 17:41	37,714
16	04/04/2014 20:41	37,935	59	04/05/2014 18:11	37,824
17	04/04/2014 21:11	37,935	60	04/05/2014 18:41	37,714
18	04/04/2014 21:41	37,824	57	04/05/2014 17:11	37,714
19	04/04/2014 22:11	37,824	61	04/05/2014 19:11	37,824
20	04/04/2014 22:41	37,604	62	04/05/2014 19:41	37,824
21	04/04/2014 23:11	37,714	63	04/05/2014 20:11	37,824
22	04/04/2014 23:41	37,714	64	04/05/2014 20:41	37,824
23	04/05/2014 0:11	37,714	65	04/05/2014 21:11	37,824
24	04/05/2014 0:41	37,714	66	04/05/2014 21:41	37,824
25	04/05/2014 1:11	37,714	67	04/05/2014 22:11	37,714
26	04/05/2014 1:41	37,714	68	04/05/2014 22:41	37,714
27	04/05/2014 2:11	37,714	69	04/05/2014 23:11	37,714
28	04/05/2014 2:41	37,714	70	04/05/2014 23:41	37,714
29	04/05/2014 3:11	37,714	71	04/06/2014 0:11	37,714
30	04/05/2014 3:41	37,714	72	04/06/2014 0:41	37,714

31	04/05/2014 4:11	37,714
32	04/05/2014 4:41	37,714
33	04/05/2014 5:11	37,714
34	04/05/2014 5:41	37,714
35	04/05/2014 6:11	37,714
36	04/05/2014 6:41	37,714
37	04/05/2014 7:11	37,714
38	04/05/2014 7:41	37,714
39	04/05/2014 8:11	37,824
40	04/05/2014 8:41	37,714
41	04/05/2014 9:11	37,824
42	04/05/2014 9:41	37,824
43	04/05/2014 10:11	37,714
44	04/05/2014 10:41	37,714

73	04/06/2014 1:11	37,714
74	04/06/2014 1:41	37,714
75	04/06/2014 2:11	37,714
76	04/06/2014 2:41	37,714
77	04/06/2014 3:11	37,714
78	04/06/2014 3:41	37,714
79	04/06/2014 4:11	37,714
80	04/06/2014 4:41	37,714
81	04/06/2014 5:11	37,824
82	04/06/2014 5:41	37,714
83	04/06/2014 6:11	37,824
84	04/06/2014 6:41	37,714
85	04/06/2014 7:11	37,714
86	04/06/2014 7:41	37,824
	<b>Tiempo promedio</b>	<b>37,75</b>

Elaborado por: Pamela Acosta



**GRÁFICO No 2.** Límites de control de la temperatura tras la verificación interna de la incubadora seteada a 37°C

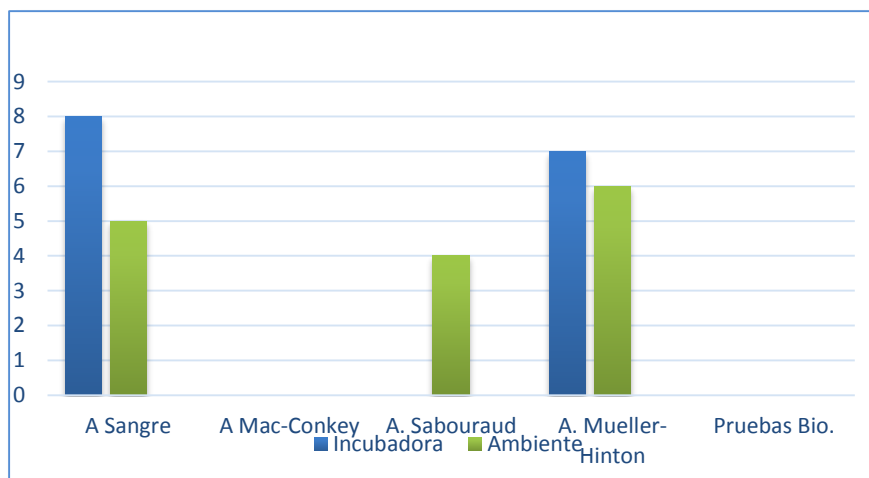
**INTERPRETACIÓN:** De acuerdo a las lecturas proporcionadas por el termohigrómetro cada media hora después de los dos días de monitoreo en la incubadora, esta tabla indica que el valor promedio es bastante bueno, ya que la temperatura de la incubadora es un factor que juega un papel muy importante dentro del desarrollo del microorganismo y sobre todo en esta investigación se observó que existe picos de temperatura que sobrepasan el valor permitido, esto pudo haberse ocasionado por algún movimiento en la botón de regulación de temperatura o variaciones en la electricidad, considerando que las altas temperaturas provocan efectos letales sobre los microorganismos, pues una bacteria

expuesta a una temperatura superior a la que normalmente crece, sufre daños en sus proteínas y ácidos nucleicos impidiendo que la bacteria formen colonias, lo cual en este caso está tiene un promedio de 37,7°C por lo tanto está dentro del rango de aceptación que es 37±1 T°C (SEIMC).

**TABLA No 8.** Screening de esterilidad de los medios de cultivos.

Agar	Numero de lotes	Número de cajas contaminadas	
		Incubadora	Ambiente
Agar sangre	10 Lotes (230)	8	5
Agar Mac-Conkey	10 Lotes (230)	0	0
Agar Sabouraud	10 Lotes (230)	0	4
Agar Mueller-Hinton	10 Lotes (230)	7	6
Pruebas bioquímicas	10 Lotes (230)	0	0
<b>TOTAL</b>		<b>15</b>	<b>15</b>
<b>FRECUENCIA</b>		<b>50%</b>	<b>50%</b>

**Elaborado por:** Pamela Acosta



**GRÁFICO No 3.** Screening de esterilidad de los medios de cultivos.

**INTERPRETACIÓN:** En este estudio realizado como screening de los medios de cultivo, se encontró que los lotes se produjo mayor contaminación en el medio de cultivo Mueller-Hinton y Sangre, con mayor frecuencia en la incubadora que en el ambiente, esto indica que probablemente está ocurriendo problemas durante el llenado de la cajas Petri pues el laboratorio no cuenta con cabina de seguridad, añadiendo la contaminación que se produjo en el ambiente también o el personal no está llevando todas las medidas



de preventivas para evitar la contaminación incluyendo la frecuencia de desinfección del equipo, por otro lado quizás el autoclave no está llegando a los parámetros de esterilidad adecuados, sin mencionar que en los agares que mayor contaminación se produjo, son agares que poseen características de enriquecimiento que facilitan el crecimiento de microorganismos y por lo tanto también la contaminación. Hay que mencionar que estos datos no se alejan de la investigación realizada por (Delgado, M. 2009) que argumenta también la importancia de tener un espacio destinado para realizar las prácticas de microbiología y tener cuidado durante el llenado de las cajas pues son parámetros que influyen en la contaminación de los medios.

**TABLA No 9.** Control de calidad pH de los medios de cultivos.

CONTROL DE CALIDAD	VALOR
A. Sangre	7,2
A. Mac-Conkey	7,3
A. Sabouraud	5,7
A. Mueller-Hinton	7,3

Elaborado por: Pamela Acosta

**INTERPRETACIÓN.** Esta tabla encontramos los resultados después de la verificación del pH de los medios de cultivos utilizados en el área de microbiología, por lo tanto las lecturas se encuentra dentro de los rangos de aceptabilidad fijados por el CLSI que es de 7,2-7,4 y en el caso de Agar Sabouraud 5,6 mencionando que este es un factor importante para el desarrollo de una bacteria pues la presencia de un pH ácido o base pueden impedir el crecimiento bacteriano, inhibirlo o incluso alterar los procesos metabólicos normales del microorganismo, mientras que en el caso de un antibiograma a pH muy bajo, ciertas antibióticos pierden potencia o presentan excesiva actividad y mientras que en un pH alto, podemos encontrar efectos opuestos, factores importantes en el diagnóstico y tratamiento de patologías.

**TABLA No 10.** Resultados de UFC utilizadas como referencia en Agar Mueller-Hinton.

Repeticiones	DIL 10 <sup>-5</sup>	DIL 10 <sup>-6</sup>	DIL 10 <sup>-7</sup>
1	146	16	1
2	155	14	1
<b>Promedio</b>	105,5	15	1

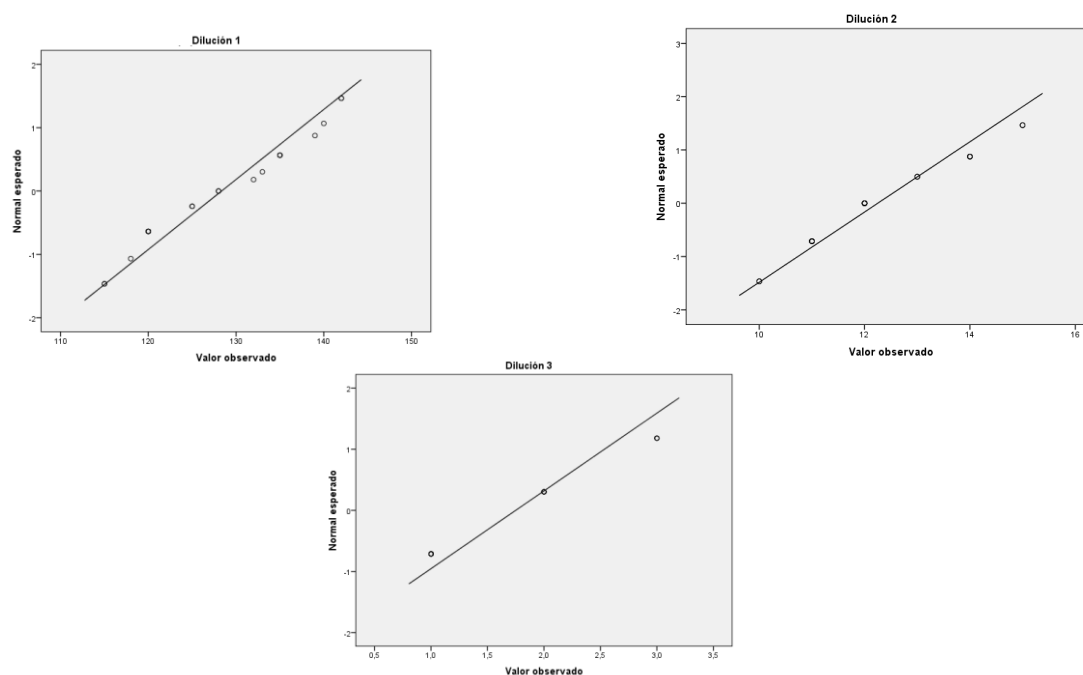
Elaborado por: Pamela Acosta

**INTERPRETACIÓN.** Representan los valores obtenidos del pre-análisis realizado por duplicación obedeciendo la metodología según la escala 0,5 McFarland tomadas como referencia a partir del Agar Mueller-Hinton para obtener una concentración conocida de la cepa, pues en este medio se obtuvo una buena recuperación del microorganismo.

**TABLA No 11.** Resultados de las diluciones en UFC del Agar Mac-Conkey.

Repeticiones	Dilución 1 ( $10^{-5}$ )		Dilución 2 ( $10^{-6}$ )		Dilución 3 ( $10^{-7}$ )	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1	120	115	10	12	1	1
2	139	142	11	13	2	2
3	132	120	12	15	3	2
4	115	120	14	12	2	3
5	142	135	11	12	2	1
6	135	128	12	10	1	1
7	125	125	11	13	1	2
8	133	128	12	14	2	1
9	140	135	15	11	2	2
10	118	120	11	14	2	2
<b>Promedio</b>	129,9	126,8	11,9	12,6	1,8	1,7
<b>D.E.</b>	9,75761811	8,49575057	1,52388393	1,50554531	0,63245553	0,67494856
<b>C.V.</b>	7 %	6%	12%	11%	35%	36%

Elaborado por: Pamela Acosta



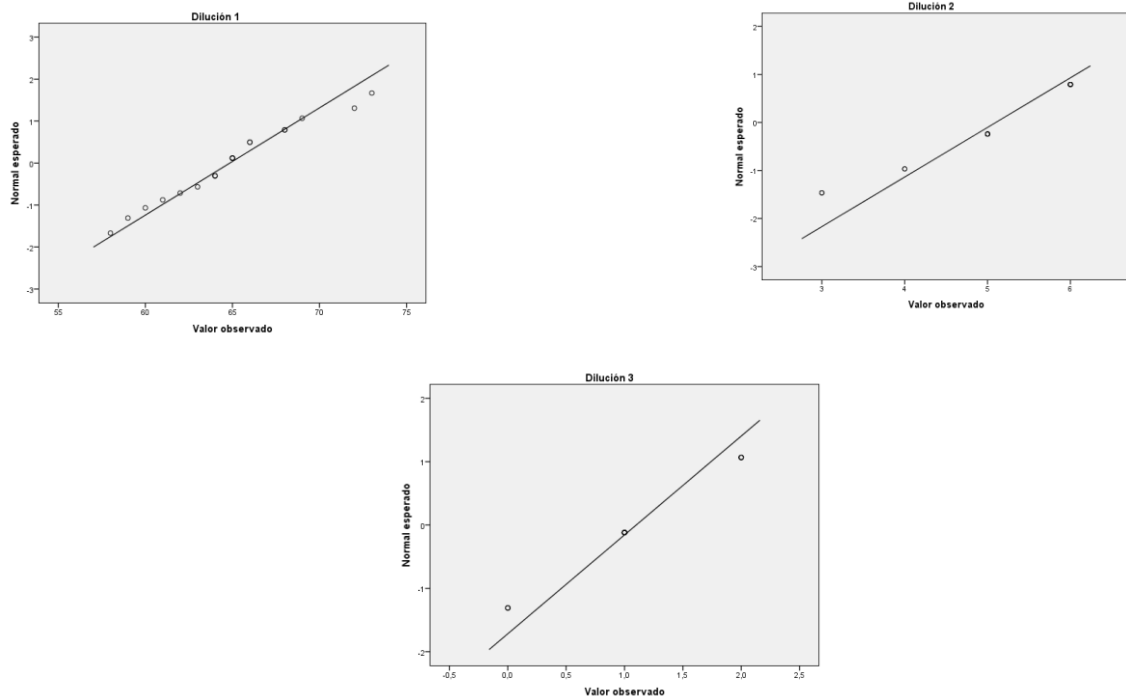
**GRÁFICO No 4.** Resultados de las diluciones en UFC de Agar Mac-Conkey.

**INTERPRETACIÓN.** De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en las 10 repeticiones de los dos días, realizado en 3 concentraciones diferentes (MSP), esto permitió identificar que hay relación entre una dilución y la otra, ya que el recuento de las UFC permitieron deducir que el nivel del analista al realizar las diluciones es buena y el procesamiento fue llevado de una manera correcta porque los resultados se encuentra dentro de los rangos de precisión permitidos por la (USP), este ensayo de pasos secuenciales permitió conocer la validez del medio de cultivo que está siendo utilizado actualmente en el laboratorio y muestra en primera instancia que el medio de cultivo replico adecuadamente la bacteria ya que mientras más alta la concentración menor el número de colonias aisladas, por otro lado la temperatura de la incubadora está funcionando bien al igual que el pH y por ende produce los efectos que necesitamos sobre las bacterias.

**TABLA No 12.** Resultados de las diluciones en UFC del Agar Sangre.

Repeticiones	Dilución 1 ( $10^{-5}$ )		Dilución 2 ( $10^{-6}$ )		Dilución 3 ( $10^{-7}$ )	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
<b>1</b>	69	65	6	3	2	1
<b>2</b>	62	68	5	6	1	0
<b>3</b>	58	64	3	4	2	1
<b>4</b>	64	65	6	6	1	1
<b>5</b>	65	66	6	5	1	2
<b>6</b>	72	64	5	5	1	1
<b>7</b>	65	60	6	4	0	1
<b>8</b>	63	59	5	3	2	1
<b>9</b>	66	73	6	5	1	0
<b>10</b>	61	68	4	6	1	2
<b>Promedio</b>	64,5	65,2	5,2	4,7	1,2	1
<b>D.E.</b>	3,97911213	4,02216083	1,03279556	1,15950181	0,63245553	0,66666667
<b>C.V.</b>	6%	6%	19%	24%	52%	66%

**Elaborado por:** Pamela Acosta



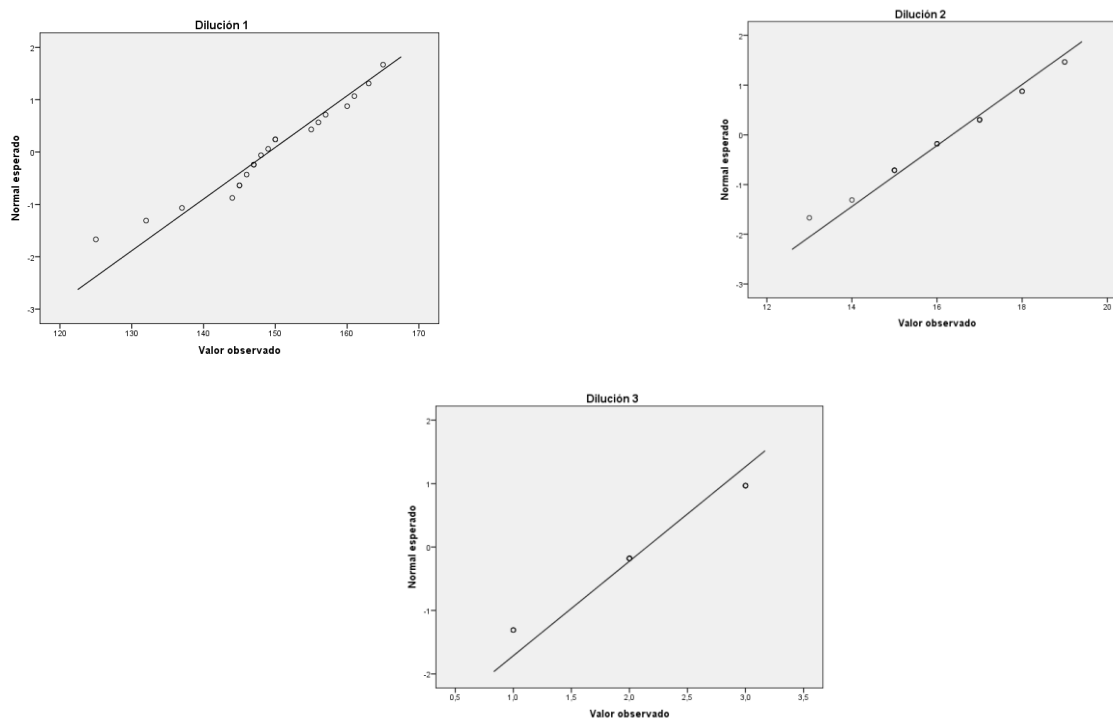
**GRÁFICO No 5.** Resultados de las diluciones en UFC del Agar Sangre.

**INTERPRETACIÓN.** Estos fueron los resultados obtenidos de las diluciones del agar sangre, en este caso las tres diluciones fueron importantes pues la última no estuvo dentro de los rangos aceptables de precisión inclusive no existió crecimiento en algunas placas de esta dilución, pero hay que considerar que no significa que el ensayo se haya ejecutado mal ya que las diluciones realizadas por el personal fueron hechas de una manera correcta y en términos de microbiología es más complejo mantener una homogeneidad pues son microorganismos vivos, tomando en cuenta que la profundidad es un factor que también pudo haber influido y no es tomado en cuenta en el laboratorio, por otro lado los valores de las UFC obtenidos en este agar se denota que el medio no es muy selectivo o a su vez no recupera de la mejor manera la bacteria y en términos porcentuales apenas recupera el 50% en relación del Agar Mac-Conkey pero en términos generales el medios replica bien la bacteria pero no es específico para esta.

**TABLA No 13.** Resultados de las diluciones en UFC del Agar Mueller-Hinton.

Repeticiones	Dilución 1 ( $10^{-5}$ )		Dilución 2 ( $10^{-6}$ )		Dilución 3 ( $10^{-7}$ )	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
1	149	132	17	15	2	2
2	165	145	18	16	2	3
3	156	148	19	17	3	2
4	157	147	16	14	2	1
5	137	144	13	15	3	2
6	155	150	17	15	1	2
7	125	145	18	17	1	3
8	161	146	19	18	2	2
9	150	163	17	16	2	3
10	147	160	15	15	3	2
<b>Promedio</b>	150,2	148	16,9	15,8	2,1	2,2
<b>D.E.</b>	11,8302813	8,61523199	1,85292561	1,22927259	0,73786479	0,63245553
<b>C.V.</b>	8%	6%	10%	7%	35%	28%

Elaborado por: Pamela Acosta



**GRÁFICO No 6.** Resultados de las diluciones en UFC del Agar Mueller-Hinton.

**INTERPRETACIÓN.** De acuerdo a los valores que fueron obtenidos de las 3 diluciones de los dos días diferentes, aquí también se coincidió que existe homogeneidad entre las tres diluciones y por otro lado se encuentran dentro de los rangos de precisión, con este ensayo se determinó que este medio, es el que de acuerdo con la metodología tradicional mejor recupero y replico la bacteria tomando en cuenta que cumple con un pH 7,3 pero

la profundidad es un factor que no es tomado en cuenta dentro del laboratorio, por la misma circunstancia con el análisis realizado es muy importante saber que concentraciones que se siembran ya que del pH y la profundidad influye en las lecturas de los antibiogramas para que exista falsos positivos o falsos susceptibles parámetro muy importante para el tratamiento y control de una patología, sin mencionar que en este caso constantemente se debe que verificar el pH porque es un medio que se encuentra dentro de los no exentos lo que quiere decir su esterilidad y funcionamiento pueden variar en cada lote (SEIMC).

**TABLA No 14.** Resultados de las diluciones del Agar Sabouraud.

Agar Sabouraud con Antibiótico
NO HAY CRECIMIENTO

**Elaborado por:** Pamela Acosta

**INTERPRETACIÓN.** Son los resultados que fueron obtenidos de las 3 diluciones en 10 repeticiones, realizados en los dos días diferentes, indica que este medio no permitió el crecimiento bacteriano, por lo tanto la cantidad de antibiótico suministrada en el agar es la adecuada para impedir el crecimiento de las bacterias por lo tanto agar está funcionando bien.

## 4.2. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Realizando un análisis posterior de todos estos parámetros y establecer las condiciones que debe poseer el medio de cultivo tras su reconstitución deben cumplir con las pruebas pH, esterilidad, profundidad y capacidad de crecimiento y reacción son las principales características que nos ayuda a definir que un medio de cultivo tiene un funcionamiento correcto y definimos claramente que gran parte de análisis final mediante la cepa control observamos que depende la prevención de los factores que se evidencia claramente con el análisis del recuento UFC que ayudan a conocer en resumidas cuentas todo el procedimiento al evidenciar los parámetros de precisión.

## 4.3. VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS

**H1:** La fase preanalítica influye en la confiabilidad de los resultados en el área de microbiología del laboratorio clínico Ambalab.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- ✓ Dentro de los puntos críticos que se identificó previo al procesamiento de rehidratación de los medios se obtuvieron que algunos parámetros tienen que ser mejorados como es en el ámbito de registros que se llevan dentro del área pues son parámetros que forman parte de control de calidad interno.
- ✓ En cuanto a las condiciones que debe poseer un medio de cultivos principalmente la profundidad y por otro lado la esterilidad fueron los parámetros que se identificaron en la investigación e influyen en la determinación final del microorganismo objeto de estudio que en este caso deben ser mejorados, tomando en cuenta la prevención de factores tanto externos como internos garantizan un procedimiento de calidad.
- ✓ De acuerdo a las observaciones realizadas al validar los medios de cultivo indicados se puede mencionar que el medio Mueller-Hinton es el medio de cultivo de acuerdo a metodología tradicional apropiado para el desarrollo de *E. coli*, teniendo como un medio sustituto al Mac-Conkey, mientras que el agar sangre muestra una clara diferencia de recuperación de bacterias, cabe señalar que se trabajó con una cepa de *E. coli* para dicho ensayo en pasos secuenciales de prevalidación, validación y hasta evaluación de medio para determinar viabilidad de cepa.
- ✓ La realización del manual de control de calidad interno fue un conjunto de información recolectado tanto de páginas virtuales como físicas conformado por varias secciones que complementa el protocolo para evaluar la calidad del procedimiento dentro del área.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda que el tema sea promovido más como ámbito de investigación pues no hay suficiente bibliografía que pueda documentar control de calidad dentro de microbiología clínica.
- Se recomienda fomentar la práctica dentro de control de calidad en los laboratorios clínicos e impulsar la validación de los procesos dentro de los mismos.
- Se recomienda a los laboratorios para una mejora continua de los resultados clínicos la implementación de indicadores que puedan mejorar la calidad tanto de los procesos como de los resultados procurando la satisfacción del paciente.



## **CAPÍTULO VI**

### **PROPUESTA**

#### **6.1. DATOS INFORMATIVOS**

##### **6.1.1. Título**

Formulación de un manual de control de calidad interno para el área de microbiología del laboratorio “Ambalab”, para reforzar procesos técnicos.

##### **6.1.2. Institución Ejecutora**

Laboratorio Clínico “Ambalab”

##### **6.1.3. Ubicación**

Se ubica en la calle Bolívar y Constantino Fernández

##### **6.1.4. Población beneficiada**

Laboratorio “Ambalab”

##### **6.1.5. Equipo técnico responsable**

Pamela Acosta bajo la asesoría de la Dra. Martha Ramos

##### **6.1.6. Tiempo estimado para la ejecución**

Fecha Inicial: Septiembre 2014.

Fecha Final: Octubre 2014

### **6.1.7. Costo**

La propuesta a realizarse no tiene ningún costo para el laboratorio, además del manual que será entregado al laboratorio que se gastará para la impresión del mismo un valor de 25 dólares. Todo esto se realizará para la mejora de los resultados del área de microbiología de la entidad antes mencionada.

## **6.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA**

En la presente investigación después de la evaluación correspondiente se verificó que los resultados finales dependen en gran medida del procedimiento que es llevado a cabo para la rehidratación de los medios, sin contar una serie de factores que de una u otra manera pueden afectar la confiabilidad de los resultados, así mismo de las medidas preventivas que se toma en cuenta durante todo el procesamiento de los mismos. Pues no sería útil realizar un procesamiento de una forma correcta si al final se tienen contaminaciones cruzadas.

En el estudio, con los resultados finales se pudo observar que la bacteria *E. coli* cultivada en los cuatro medios de cultivos diferentes, bajo el mismo procedimiento y condiciones nos muestra que la bacteria reacciona de manera independiente por lo tanto los resultados son diferentes, es decir que a pesar de realizarse un procedimiento correcto es más difícil controlar la homogeneidad del crecimiento, pues son microorganismos vivos y reaccionan de una manera diferente. Es necesidad que el área de microbiología debe poseer procedimientos que permitan conocer la calidad de los resultados, no sólo de una manera objetiva sino de una manera estadística también, y por lo que debe existir un documento con información que respalde las prácticas dentro del laboratorio y que cualquier técnico clínico pueda usarlo.

### **6.3. JUSTIFICACIÓN**

El interés de la entrega de resultados de calidad que proporcionen un diagnóstico para un posterior tratamiento del paciente, requiere de protocolos que aseguren un procedimiento seguro, pues para ello es necesario que exista documentos que respalden con información y bases técnicas para llevar a cabo un resultado confiable. Se considera que es de mucha importancia el contenido del manual ya que se van a reforzar conocimientos del personal además de encontrarse detallados los procedimientos de manejo de cepas control, que permitirán el desarrollo de prácticas y proporcionar información estadística que respalden el método utilizado.

Es de beneficio para el laboratorio, el personal que labora, sin mencionar a los pacientes que asistan ahí, ya que el manual proporcionará información que contribuya no solo con la mejora de la calidad de los resultados sino también del aseguramiento de los métodos utilizados en el área.

### **6.4. OBJETIVOS**

#### **6.4.1. Objetivo general**

Formular un manual de control de calidad interno para el área de microbiología del laboratorio “Ambalab”, para reforzar procesos técnicos.

#### **6.4.2. Objetivos específicos**

- Identificar los objetos que comprenden la documentación del manual de control de calidad interno en microbiología.
- Elaborar la documentación por orden jerárquico.
- Presentación para revisión del documento.

### **6.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS DE LA PROPUESTA**

Al término de la investigación se aportará con un documento que dispondrá de información necesaria y bases científicas, que serán de utilidad técnica en la ejecución de

los procedimientos que el personal podrá ponerlo en práctica. Que durante la elaboración de este manual y la capacitación se lo ha realizado en base a tres valores de responsabilidad, respeto y honestidad.

## **6.6. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

La capacitación al personal del laboratorio es una propuesta factible ya que se cuenta con la participación del personal para realizarla, la información técnica que sustente la capacitación y además de la asesoría correspondiente.

**Política:** las autoridades correspondientes no tienen problema con permitir que el personal reciba la capacitación y sin mencionar la disponibilidad de los mismos, para recibir una capacitación del manual ya que consideran que el mismo va a ser muy beneficioso para el laboratorio.


**Tecnología:** en este caso se utilizara charlas y carteleras de conceptos importantes que consta un manual, documento que se basó en información en bases bibliográficas físicas como virtuales.

## **6.7. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICA**

### **Manual de control de calidad interno**


El manual es un documento en el que se recopila y agrupan los diferentes procedimientos necesarios, teniendo como fin establecer tarea en forma ordenada y sistemática.

Dentro de laboratorio clínico debe además de proveer resultados confiables y oportunos a partir de las muestras biológicas aportar en el diagnóstico pues todo esto se lleva a cabo a través de un una mejora continua de un sistema de procedimientos que aseguren calidad a través de argumentos científicos que respalden estos procedimientos por medio del manual.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO “AMBALAB”</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

# **LABORATORIO CLÍNICO “AMBALAB”**

## **MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA**

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

## ÍNDICE CONTENIDO

### 1. CONTROL DE CALIDAD

#### 1.1. OBJETO


#### 1.2. ALCANCE

#### 1.3. RESPONSABLE:

#### 1.4. PRINCIPIO

#### 1.5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

1.5.1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .....	66
1.5.1.1. Medios de cultivo deshidratados.....	66
1.5.1.2. Medios de cultivos reconstituidos.....	67
1.5.1.3. Consideraciones para el control de calidad de los medios reconstituidos .....	68
1.5.1.4. Antibiogramas.....	69
1.5.1.5. Métodos para el control de calidad de los medios .....	70
1.5.2 Procedimiento para el análisis estadístico .....	81
1.5.2.1 Precisión.....	81
1.5.2.2. Exactitud .....	83
1.6. ANEXOS.....	85
1.7. REFERENCIAS .....	87

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:


## ÍNDICE DE TABLAS

**TABLA No 1.** Desviaciones estándar relativas en función a las UFC en placas . 83

**TABLA No 2.** Resultados de las primeras diluciones ..... 84

**TABLA No 3.** Resultados estadísticos del día 1 de la segunda dilución A. Mueller-Hinton ..... 84


**TABLA No 4.** Resultados de exactitud del día 1 de la segunda dilución A. Mueller-Hinton ..... 84

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

**GRÁFICO No 1.** Presentación de cepa de referencia ..... 73  
**GRÁFICO No 2.** Diluciones decimales de tubos con 9.0 ml..... 76



	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

## 1. CONTROL DE CALIDAD

### 1.1. OBJETO

Asistenciar los procesos microbiológicos para obtener resultados de calidad.

### 1.2. ALCANCE

Las recomendaciones proporcionadas por el manual sugieren regir los procesos desde la fase preanalítica hasta la fase postanalítica de la preparación de medios de cultivos.

### 1.3. RESPONSABLE:


**Jefe de laboratorio:** es el encargado por tener la capacidad técnica y conocimientos necesarios para llevar a cabo el control de calidad del área.

**Personal operativo:** son los responsables de ejecutar los procesos de análisis de muestras clínicas.

### 1.4. PRINCIPIO

El laboratorio clínico de microbiología debe tener adecuado funcionamiento y constante control de calidad en todas las fases.

En general este control proporciona resultados de calidad y por ende la satisfacción del paciente. En este contexto el control de calidad envuelve el monitoreo de los medios de cultivos, reactivos, instrumentos, procedimientos y el personal, para asegurar una identificación y caracterización de agentes etiológicos y su correspondiente prueba de susceptibilidad como una guía de la terapia.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

Un programa de control de calidad debe promover una mejora continua tanto de equipos, actualización de conocimientos, elementos de bioseguridad y una supervisión sobre los reportes generados.

## **1.5. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD**


Este parámetro es un poco difícil cuantificarlo ya que se rige la calidad y la satisfacción de los pacientes. La calidad nos ayuda a obtener resultados óptimos mediante procedimientos rápidos y seguros. Esto incluye entrenamiento y calificación del personal, evaluación de los reportes, rapidez y seguridad diagnóstica, certificación de los laboratorios, controles externos, etc.

Por ello todo el personal que tiene que ver con estas responsabilidades, debe comprender lo determinante que es la conservación de la calidad de la muestra, durante todo el procedimiento para su resultado. Es responsabilidad del laboratorio difundir información clara y comprensible en todas las áreas de trabajo, el cual debe estar siempre accesible al personal como una referencia.

### **1.5.1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

#### **1.5.1.1. Medios de cultivo deshidratados**

Los medios de cultivo deshidratados son higroscópicos y la absorción de agua del exterior, así como la formación de agua dentro de la botella 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. Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo deshidratado, con el nombre del producto, nombre y número telefónico de la casa proveedora, número de control del frasco, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	<b>Fecha de aprobación:</b>	<b>Aprobado por:</b>


se abrió el frasco. Utilizando condiciones de almacenamiento adecuadas, los medios elaborados en polvo tienen una vida útil de al menos 3 años. Tras la recepción de los medios en el laboratorio y antes de usarlos, hay que comprobar las características físicas (color, precipitados, placas rotas.) y se debe documentar cualquier anomalía detectada (Quiroz, M. 2012).

### **1.5.1.2. Medios de cultivos reconstituidos**

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 capacidad del doble del medio que se quiere preparar. Cuando se va a esterilizar, debe asegurarse 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.

El medio esterilizado debe ser enfriado a 45°-60°C en un baño 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. El almacenamiento a 4°C es el mejor para la mayoría de los medios. Sin embargo, 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. Para evitar la desecación se aconseja que se guarden en bolsas plásticas bien cerradas.

Dado que los medios almacenados en refrigeración, cuando pasan a temperatura ambiente tienden a formar agua de condensación en la superficie, se recomienda poner los platos 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 la eficiencia o calidad. Puede utilizarse para ello cepas

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

bacterianas domésticas o cepas control comerciales (ATCC). Se debe guardar un libro de registro de los resultados obtenidos. Cada lote preparado se prueba antes de su uso.

- Evite el congelamiento de los medios preparados o la sangre de carnero.
- Al colocar en la refrigeradora los medios preparados, debe colocar los de más reciente preparación al fondo y los más viejos adelante.
- Rotular todos los medios preparados, tanto en platos Petri como en tubos, indicando además, la fecha de preparación y expiración.

### **1.5.1.3. Consideraciones para el control de calidad de los medios reconstituidos**

Cada lote de medio preparado, partiendo de los ingredientes individuales, o cada número de lote diferente de medio deshidratado de un fabricante debe ser probado para la esterilidad, la habilidad para soportar el crecimiento de organismo(s) específicos y la habilidad para producir reacciones bioquímicas de manera apropiada.

#### **a) Esterilidad**

Incuba toda la noche a 35°C–37°C un tubo o una placa por cada lote de medio esterilizado. Durante 48h a la T° a la que va a ser incubado en el uso con muestra clínicas y posteriormante otras 48 h a Tª ambiente.

#### **b) Control de pH:**


Se controlará el pH del medio en cada lote de preparación, teniendo como rango de 7.2 a 7.4 después de gelificar a temperatura ambiente.

#### **c) Profundidad del agar**

El estándar es de 4 mm. Se utilizará un vernier o una aguja con la marca de la medida y probar en cuatro cuadrantes y el centro de la placa (Gómez, K.).

60 – 70 ml de agar para placa de 150 mm.

25 – 35 ml de agar para placas de 100 mm.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

#### 1.5.1.4. Antibiógramas.


El CLSI sugiere pasar a frecuencia semanal sólo si no se sobrepasa la cifra de 3 diámetros de inhibición o de tres valores de CMI incorrectos de cada 30 ensayados. Hay que dejar constancia de estos controles con sus resultados en un formulario preparado con esa finalidad. El laboratorio con las cepas de referencia (características físicas, esterilidad, funcionamiento). Estos ensayos deben incluir los antibióticos que se utilizan con cada medio. Si los valores obtenidos no son los esperados hay que revisar los siguientes aspectos:

- Verificar que el resto de los reactivos utilizados (discos y antibióticos) ya han sido sometidos al correspondiente control de calidad.
- Revisar las características físicas del medio, por ejemplo, las placas con poco agar, por debajo de 15 ml por placa, es fácil que provoquen que los halos sean mayores de los debidos, lo contrario puede suceder con placas de mayor espesor (Cercenado, E.; Cantón, R. 2009).

##### a) Control del inóculo

La densidad del inóculo también afecta al rendimiento del antibiógrama. Los inóculos con mayor carga bacteriana de la normalizada provocan diámetros de inhibición menores o CMIs más elevadas de las debidas, ocurriendo lo contrario cuando el inóculo es demasiado bajo.

CLSI y de otros organismos habitualmente aparece como inóculo normalizado el equivalente al 0,5 de la escala de McFarland. Es recomendable realizar periódicamente, controles de los inóculos preparados para llevar a cabo las distintas técnicas de antibiógrama; para ello, se puede realizar un cultivo cuantitativo a partir de la suspensión bacteriana, y comprobar que el recuento obtenido está dentro de lo esperado según el microorganismo y técnica empleada (normalmente entre  $10^5$ - $10^8$  UFC/mL).

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

### 1.5.1.5. Métodos para el control de calidad de los medios

#### 1.5.1.5.1. Cepas de control de calidad

a) **Cepas de referencia.** Las cepas de referencia o cepas patrón se definen como microorganismos procedentes de un cultivo puro, definidos por lo menos al nivel de género y especie, catalogados y descritos según sus características y preferiblemente de origen conocido.


b) **Cepas de reserva:** Se obtienen por subcultivo en los medios adecuados de las cepas de referencia.

Las cepas de reserva se pueden conservar mediante liofilización, en nitrógeno líquido o congeladas a temperaturas  $\leq -50^{\circ}\text{C}$  en medios con agentes estabilizantes para la congelación, por ejemplo, caldo de soja tripticasa con glicerol al 10-15% v/v o tubos comerciales con 20-30 esferas/tubo (permiten tomar una esfera sin necesidad de descongelar todo el tubo). En estas condiciones pueden mantenerse indefinidamente y a temperaturas entre  $-50^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  se pueden conservar hasta un año.

c) **Cepas de trabajo:** Se obtienen por subcultivo de las cepas de reserva, una vez descongeladas, en medios sólidos seleccionados según el microorganismo. Se conservan a  $2-8^{\circ}\text{C}$  o a temperatura ambiente durante un máximo de un mes, siempre que se asegure la viabilidad de la cepa. De las cepas de trabajo se pueden realizar como máximo tres subcultivos, siempre que la cepa conserve sus características. Deben reemplazarse a partir de la cepa de reserva congelada. Las cepas de trabajo no se deben subcultivar para sustituir a las cepas de reserva.

#### 1.5.1.5.2. Habilidad de soportar el crecimiento de organismos específicos

##### 1.5.1.5.2.1. Procedimiento de preparación, equipos e instrumental

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

### **Incubadora**


- Se monitorea la temperatura a través del aplicativo termohigrómetro dentro de la incubadora.
- Se evita abrir innecesariamente.
- Realizar las lecturas cada media hora.
- Colocar el termohigrómetro como mínimo durante dos días dentro de la estufa.
- Con el rango de lecturas se establece un promedio el cual nos dará un valor más acertado al cual está trabajando la estufa considerando que lo ideal sería a 37°C.
- El rango de temperaturas se debe anotar en un registro que se muestra. (ANEXO 1)

### **Autoclave**

- Utilizar la cinta testigo que es un control químico que nos permite verificar la esterilización del autoclave.
- Colocar un fragmento de cintas en los medios cada lote que fue preparado.
- La verificación del buen funcionamiento es el viraje de color carmel a negro. Ya que va partir de un cultivo derivado de una cepa específica de *Bacillus stearothermophilus* impregnadas en una tira de papel de calidad satisfactoria permeable por el vapor, la cepa se caracteriza por su resistencia a la esterilización por vapor y es lo que permite el cambio de color de la cinta testigo.

### **Análisis ambiental del área de trabajo**

- Utilizar 6 cajas sabouraud y 6 placas petrifilm (estos reactivos nos permitirán reconocer tanto la presencia de hongos como el recuento de aerobios).
- Colocar las 3 cajas de sabouraud y las 3 placas petrifilm en tres sitios específicos del espacio que se va a trabajar antes de la desinfección de rutina. El mismo que abarca lo que el mechero cubre que es 50 cm de radio.
- Las cajas serán expuestas por 15 min.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	<b>Fecha de aprobación:</b>	<b>Aprobado por:</b>

- Después de desinfectar el área de trabajo con alcohol al 90% y colocar las otras 3 cajas de sabouraud y las 3 de las placas petrifilm en el mismo sitio que fueron expuestas las cajas anteriores.
- También estas cajas exponerlas por 15 minutos.
- Posteriormente se incuba las 6 placas Petrifilm por 37°C por 48H (es decir 2 días) y las 6 cajas de Agar Sabouraud a 25°C por 5 días.
- Después del tiempo de incubación, se procede hacer la observación de las cajas de Agar Sabouraud y los recuentos de las colonias de las placas petrifilm, que consiste en determinar las características de acuerdo al siguiente detalle. (ANEXO 2)


#### 1.5.1.5.2.2. Estudio de medios de cultivos

##### a) Activación de la cepa control (KWIK-STIK™ Plus).

KWIK-STIK™ Plus™, es una clase de presentación de las cepas de referencia, que en este caso es utilizada para realizar el control. Cada preparado de microorganismos liofilizados es igual a dos (2) pasajes desde un cultivo de referencia. Se procesa de la siguiente manera:

1. Sacar la unidad **KWIK-STIK™** del almacenamiento a 2°C a 8°C y permitir que la bolsa cerrada alcance temperatura ambiente.
2. Abrir la bolsa y sacar la unidad **KWIK-STIK™**.
3. Quitar la parte removible de la etiqueta del equipo **KWIK-STIK™**. La etiqueta puede adherirse a registros permanentes de control de calidad o a la placa primaria del medio de agar, como identificación.
4. Tomar nota de la posición de la pastilla en el fondo del equipo y del depósito de líquido hidratante en la parte superior (tapa) del equipo. **NO** derramar durante la hidratación.
5. Liberar el líquido hidratante, pellizcando la ampolla de la tapa del equipo para romperla. Permitir que el líquido hidratante fluya por el tallo del hisopo a la parte inferior de la unidad, donde está la pastilla de gelatina.
6. Sostener el equipo en posición vertical, con la tapa hacia arriba, y golpear la base del equipo suavemente contra el mostrador para facilitar el flujo del líquido.



	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

7. Pellizcar la parte inferior de la unidad para triturar la pastilla y mezclar en el líquido, hasta que las partículas de la pastilla tengan un tamaño uniforme y la suspensión tenga un aspecto homogéneo.

8. Saturar **INMEDIATAMENTE** el hisopo con el material hidratado y transferir el material a un medio apropiado no selectivo, ya sea un nutriente o un agar-agar enriquecido. Girar el hisopo, aplicando leve presión, para inocular un área circular (de una pulgada o 25 mm de diámetro) del medio de agar. Usar el mismo hisopo o un lazo estéril para rayar y hacer surcos repetidamente (unas 10 a 20 veces) en el área inoculada y luego seguir rayando el resto de la superficie del agar.

9. Incubar **INMEDIATAMENTE** el medio inoculado con la temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo (Microbiologics. 2007).




**Gráfico No 1.** Presentación de cepa de referencia

**Fuente:** (Montoya, M. 2007)

### c) Estándar de turbidez para preparación del inóculo

Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez de BaSO<sub>4</sub>, equivalente a un estándar 0.5 McFarland o su equivalente óptico. Un estándar de 0.5 McFarland de BaSO<sub>4</sub> se preparó como sigue:

1. Una alícuota de 0,5 mL de 0,048 m/L de BaCl<sub>2</sub> (1,175% p/v BaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O) se agrega a 99,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 0,18 mol/L (1% v/v) con agitación constante para mantener la suspensión.


	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

2. La densidad correcta del estándar de turbidez se verifica usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08 a 0,10 para el estándar de 0,5 McFarland.
3. La suspensión de Sulfato de Bario se transfiere en alícuotas de 4 a 6 mL a tubos con tapa atornillada del mismo tamaño que aquellos que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias.
4. Estos tubos deben ser bien sellados y almacenados en la oscuridad a temperatura ambiente.
5. El estándar de turbidez se debe agitar bien en un vórtex antes de usar y se debe revisar que haya una apariencia turbia uniforme. Si aparecen partículas grandes debe ser reemplazado.
6. El estándar de Sulfato de Bario debe ser reemplazado o verificado su densidad mensualmente

#### **d) Preparación del inóculo**

1. Tomar del cultivo a partir de cepa KWIK-STIK™ Plus™ al menos 1 a 2 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología bien seleccionadas de un medio de cultivo. Se toca la colonia por arriba con un asa y el crecimiento se transfiere a un tubo con 4 a 5 mL solución salina al 0,85%.
2. El caldo de cultivo se incuba a 37°C hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar de 0.5 McFarland (usualmente 2 a 6 horas). Esto resulta en una suspensión que contiene aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UCF/mL.

Para realizarlo de mejor manera se puede hacer usando un espectrofotómetro o, si se hace visualmente debe tener luz adecuada para comparar el inóculo con el estándar de 0,5 McFarland contra un fondo blanco con líneas negras contrastantes (Prat, S.).


	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

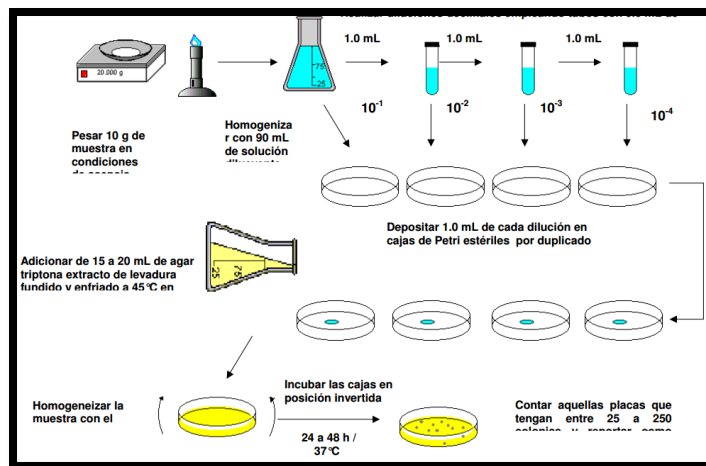
**e) Preparación de agua peptona**

- Preparar 1,5 g del polvo en 100 mL de agua. Calentar hasta que se disuelva.
- Se esteriliza a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

**f) Pre-análisis**

- Realizar 5 diluciones de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  a partir del tubo 0,5 a la escala Mcfarland.
- En los 5 tubos se adiciona 9 mL de agua peptonada.
- En el primer tubo se adiciona, 1mL del tubo que contiene la cepa a una concentración 0,5 a la escala Mcfarland, se sube y se baja la suspensión, tres veces, con la misma pipeta para homogenizar la dilución.
- De la suspensión realizada anteriormente del primer tubo (dilución  $10^{-1}$ ) se toma 1mL, y se traspa al segundo tubo (dilución  $10^{-2}$ ), se homogeniza bien y del segundo al tercero y de esa misma manera hasta la quinta dilución.
- Después de cada dilución se toma 1 mL, se coloca en las cajas Petri, se adiciona medio no selectivo o PCA (Plate Count Agar) a una temperatura aceptable de 50°C, aproximadamente 25 mL de agar. Se siembra por duplicado.
- Homogenizar cuidadosamente; para ello mezclar el inóculo con el medio, colocando la caja sobre la mesa y girar 5 veces en el sentido de las manecillas del reloj, 5 veces en sentido inverso, 5 veces hacía adelante atrás y 5 en sentido horizontal.
- Adicionalmente colocar una caja Petri etiquetada como "Control" no está inoculada con la muestra, pues nos permite observar si existiera contaminación en el medio.
- Se incuba los medios de cultivo a 37°C por 48H.
- Es importante realizar el recuento de las colonias tanto a las 24H como a las 48H.
- Se procede a observar en cuál de las cajas nos permite hacer un recuento. Y se procede al recuento. (Ver tabla 2)

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:



**Gráfico No 2.** Diluciones decimales de tubos con 9.0 ml


**Fuente:** (Camacho, A. 2009).

### g) Preparación de cepa de reserva

- De la dilución que nos permitió hacer el recuento colocar 1 mL en un tubo eppendorf.
- Suspender en 1 mL de caldo de cultivo apropiado caldo cerebro corazón (BHI) con glicerol al 20%, estéril, hasta obtener una suspensión visiblemente turbia.
- Esta suspensión se homogeniza bien y se dispensa asepticamente en criovial.

### h) Pre-análisis

- Se realizará 3 diluciones de  $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ .
- En los 3 tubos se adiciona 9 mL de agua peptonada.
- En el primer tubo se adiciona 1 mL de cepa de reserva se sube y se baja la suspensión, tres veces, con la misma pipeta para homogenizar la dilución.
- De la suspensión realizada anteriormente del primer tubo (dilución  $10^{-1}$ ) se toma 1 mL, y se traspasa al segundo tubo se homogeniza bien y del segundo al tercero y de esa misma manera hasta la tercera dilución.
- Después de cada dilución se toma 1 mL, se coloca en las 3 cajas petri para cada agar y se procede a añadir de 25 mL aproximadamente del Agar Sangre, Mac-Conkey, Mueller-Hinton y Sabouraud respectivamente, a una temperatura aceptable de  $50^{\circ}\text{C}$  aproximadamente.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	<b>Fecha de aprobación:</b>	<b>Aprobado por:</b>


- Homogenizar cuidadosamente; para ello mezclar el inóculo con el medio, colocando la caja sobre la mesa y girar 5 veces en el sentido de las manecillas del reloj, 5 veces en sentido inverso, 5 veces hacía adelante atrás y 5 en sentido horizontal.
- Adicionalmente se realizar un estriamiento de la cepa en cada uno de los medios y una caja Petri etiquetada como "Control" no es inoculada con la muestra, pues esto nos permitirá evaluar la viabilidad de la cepa y si existiera contaminación en el medio.
- Se incuba los medios de cultivo a 37°C por 48H. Junto con placas en blanco de cada uno de los medios.
- Es importante realizar el recuento de las colonias tanto a las 24H y a las 48H.
- Al término de la incubación, hacer el recuento de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/mL. Las colonias pueden encontrarse sobre, inmersas y debajo del medio de cultivo.
- Este procedimiento se realizará otro día con otro personal técnico o en todo caso la misma muestra es enviada a otro laboratorio para medir la reproducibilidad.

### **Agar Sangre**

- Se prepara 8 g del agar en 200 mL de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se autoclava a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Se enfría a 60°C.
- Se añade el 5% de sangre estéril (añada 10 mL de sangre a 200 mL de agar).
- Posteriormente a una temperatura aproximada de 50°C y procede a dispensar el agar en las cajas Petri que anteriormente contenían el 1mL de la dilución con la cepa control ATCC.

### **Agar Mac-Conkey (AMC)**

- Se prepara 10 g del agar en 200 mL de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se esteriliza el medio por autoclave a 121°C durante 15 minutos y a 15 libras de presión.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

- Posteriormente a una temperatura aproximada de 50°C y procede a dispensar el agar en las cajas Petri que anteriormente contenían el 1mL de la dilución con la cepa control ATCC.

### **Mueller-Hinton**

- Se prepara 7,6 g del agar en 200 mL de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se autoclava a 121°C durante 15 minutos y a 15 libras de presión. Se enfría a 60°C.
- Posteriormente a una temperatura aproximada de 50°C y procede a dispensar el agar en las cajas Petri que anteriormente contenían el 1mL de la dilución con la cepa control ATCC.


### **Agar Sabouraud con antibiótico**

- Se suspende 6,5 g del medio en 200 mL de agua. Se mezcla bien y se calienta con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se esteriliza en el autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.
- Posteriormente a una temperatura aproximada de 50°C se añade en el agar la ampollita de gentamicina con una concentración de 80mg.
- Se procede a dispensar el agar en las cajas Petri que anteriormente contenían el 1mL de la dilución con la cepa control ATCC.

## **PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

### **Agar TSI**

- Se prepara 7,6 g del agar TSI en 100 mL de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se deposita 3 mL en un tubo de ensayo.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

- Después se introduce los tubos al autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión).
- Se deja que el medio se solidifique y se seque en forma inclinada; y se conserve los tubos a 4°C.

### **Agar Citrato**


- Se prepara 2,4 g de agar Citrato en 100 mL de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se deposita 3 mL en un tubo de ensayo.
- Después se introduce los tubos al autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión).
- Se deja que el medio se solidifique y se seque en forma inclinada; y se conserva los tubos a 4°C.

### **Agar SIM**

- Se prepara 3,6 g de agar SIM en 100 mL de agua destilada. Se mezcla bien y se calienta con agitación suave hasta su completa disolución.
- Se deposita 4 mL en un tubo de ensayo.
- Después se introducen los tubos al autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión), se deja que se enfríe el medio.
- Se deja que el medio se solidifique y se seque en posición vertical; y se conserva los tubos a 4°C.

### **Urea**

- Se prepara 29 g de urea en 150 mL de agua. Se calienta hasta que se disuelva.
- Se deja reposar de 10 a 15 min.
- Se distribuye 2 mL en un tubo de ensayo.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

- Después se introducen los tubos al autoclave durante 15 min a 121°C (15 libras de presión), se deja que se enfríe el medio.
- Se conserva los tubos a 4°C.


### **FRESCO:**

1. Etiquetar 2 placas de portaobjetos con las numeraciones respectivas.
2. Colocar una gota de solución salina en cada placa y con la ayuda del asa obtener de cada uno de los microorganismos una colonia, la cual se debe mezclar con el suero fisiológico hasta que esté completamente diluida.
3. Cubrir cada placa con sus respectivas placas cubreobjetos.
4. Observar en el microscopio óptico con los siguientes lentes objetivos: 4,10 y 40 x.
5. Se anota las observaciones con el lente de 40x.

### **TINCIÓN DE GRAM:**

- a) Etiquetar las placas con las mismas numeraciones respectivas.
- b) Colocar una gota de suero fisiológico en cada placa y con la ayuda del asa obtener de cada uno de los microorganismos una colonia la cual se debe mezclar con suero fisiológico hasta que esté completamente diluida.
- c) Las placas fueron expuestas en la incubadora hasta que la muestra este completamente seca.
- d) Primeramente colocar una cantidad suficiente de cristal violeta, esperar 1 minuto y enjuagar con agua destilada.
- e) Seguido colocar una cantidad suficiente de lugol, esperar 1 minuto y enjuagar con agua destilada.
- f) Proseguir a decolorar con alcohol o cetona, esperamos 30 segundos y enjuagar con agua destilada.
- g) Por último colocar la safranina esperamos 1 minuto y enjuagar con agua destilada.
- h) Dejar que las placas se sequen al ambiente para proseguir con la observación.



	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

- i) La observación se realiza con el lente de 100 X, con la utilización del aceite de inmersión y se anota lo observado (Gegmic, A. 2004).

## **SIEMBRA:**

### **a) Siembra en medio líquido:**

Se introduce el asa de siembra en el tubo con cultivo crecido y se toma un inóculo que se lleva al tubo estéril con medio líquido (agitándola en el seno del medio), tomando las precauciones mencionadas anteriormente.

### **b) Siembra en placa:**

Dividir la placa en tres partes, sembrar en cada tercio el inóculo tomado de los cultivos crecidos. Se introduce el asa de siembra en el tubo con cultivo crecido y se toma una gota de inóculo que se extiende sobre el agar de la placa deslizándolo suavemente por su superficie en zig-zag.


### **c) Siembra en agar inclinado:**

Se introduce el asa de siembra en el tubo con cultivo crecido y se toma un inóculo que se extiende sobre el agar inclinado deslizándolo suavemente por su superficie en zig-zag. En el caso del medio TSI, la siembra se deberá realizar tanto en superficie (aerobiosis) como en la profundidad del agar (anaerobiosis).

## **1.5.2 Procedimiento para el análisis estadístico**

### **1.5.2.1 Precisión**

Es el grado de concordancia entre los resultados independientes de una medición, obtenidos en condiciones estipuladas, ya sea de repetibilidad o de reproducibilidad y depende de la distribución de los resultados sin estar relacionada con el valor verdadero.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

Mediante los resultados del control interno de la calidad, que es estimado por la repetibilidad y la reproducibilidad.

**Repetibilidad:** Realización de los ensayos en las mismas condiciones (mismo analista, equipos, medios de cultivo).

**Reproducibilidad:** Realización de los ensayos en las condiciones más diversas (distinto analista, equipos, días, medios de cultivo).

Hay 2 formas de determinarla:

1. Hacer un mínimo de 9 determinaciones: 3 réplicas a 3 concentraciones diferentes o 9 determinaciones al 100% de la concentración normal de trabajo.
2. Hacer un mínimo de 6 determinaciones a una concentración que corresponda con la de la muestra problema. Se determina realizando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración esperada. (Diferentes días, analistas y equipo).

## DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Es la medida de cómo se dispersan los valores alrededor de la media en la distribución de valores. Se calcula con la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=0}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}$$

En donde: n es el número de valores


## DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (RSD)

Es la comparación de la desviación estándar con respecto a la media, generalmente se expresa en % y se denomina como Coeficiente de Variación. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

En donde: s es la desviación estándar

$\bar{x}$  es el promedio de las mediciones.

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

La precisión de un método microbiológico habitualmente se expresa como desviación estándar o coeficiente de variación. La desviación estándar relativa esperada en función UFC/Placa es la siguiente.

**Tabla No 1.** Desviaciones estándar relativas en función a las UFC en placas

UFC/Placa	Desviación estándar relativa
30-300	<15%
10-30	<25%
<10	<35%

Fuente: (USP 30, 2007)


### 1.5.2.2. Exactitud

Proximidad de la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mensurando. La exactitud es evaluada utilizando un mínimo de nueve determinaciones, tres concentraciones y tres determinaciones de cada concentración. (por ejemplo: concentraciones de 80%, 100% y 120% de la concentración normal de trabajo del método; o 100%, 125% y 150% cuando no se puede reproducir la matriz del analito).

La exactitud de los métodos se determinó mediante el porcentaje de recuperación, es decir mediante el número de microorganismo que se encuentren en placa y tiempo en comparación con los inóculos de microorganismos. El valor de referencia se obtiene calculando el promedio de los valores de referencia obtenidos para cada prueba por separado.

$$\text{Recuperación \%} = \frac{\text{Recuento promedio obtenido}}{\text{Valor de referencia promedio}} \times 100$$

Para que el método sea considerado exacto ha de cumplirse que el porcentaje de recuperación entre 70 y 120% (Arriola, L. 2012).

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	<b>Fecha de aprobación:</b>	<b>Aprobado por:</b>

Con los resultados procedemos a colocarlos en tablas. De la primera fase a partir del estudio del pre-análisis se realiza un promedio de las dos replicas que éste dato nos va a servir como valor de referencia. Como se muestra a continuación:

**Tabla No 2.** Resultados de las primeras diluciones

Repeticiones	DIL 10 <sup>-5</sup>
1	39
2	44
Promedio	41,5

**Elaborado por:** Investigadora

Después se procede a establecer promedios, desviación estándar y el coeficiente de variación con las fórmulas que se mostró anteriormente como en el siguiente ejemplo:

**Tabla No 3.** Resultados estadísticos del día 1 de la segunda dilución A. Mueller-Hinton

Repetición	Día 1
1	44
2	46
3	49
4	43
5	36
6	44
7	46
8	48
9	45
10	36
<b>Promedio</b>	43,7
<b>D. E.</b>	4,4484704
<b>CV</b>	10,1795661


**Elaborado por:** Investigadora

Por otro lado a partir de la cepa del valor de referencia con la fórmula de exactitud que se mostró anteriormente así:

**Tabla No 4.** Resultados de exactitud del día 1 de la segunda dilución A. Mueller-Hinton

Medio de cultivo	C. Recuperadas	Desarrollo	Exactitud
A. Mac-Conkey	12,25	12,25/41,5*100	29%

**Elaborado por:** Investigadora

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:



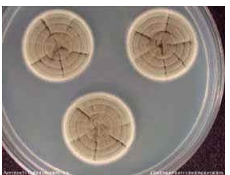


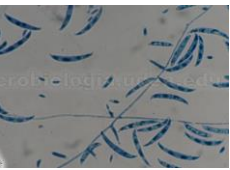
## 1.6. ANEXOS.


### Anexo 1. Registro de temperatura del incubador

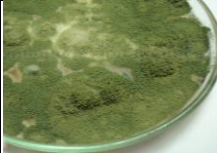

DÍA	FECHA	HORA	TEMPERATURA EN °C

Elaborado por: Pamela Acosta

### Anexo 2. Resultados de hongos ambientales en Agar Sabouraud

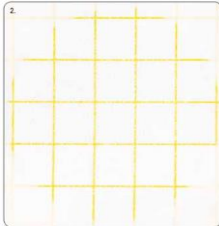
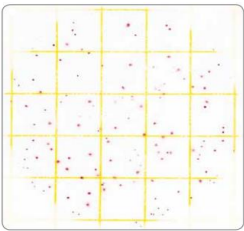
Patógeno	Características	V. referencia
<i>Penicillium</i> spp.	  <p><b>C. macroscópicas:</b> Colonias de crecimiento rápido, de inicio blanco que se torna de color verde-gris.</p> <p><b>C. microscópicas:</b> Conidióforos rectos, hialinos, con fialides que nacen sobre métulas.</p>	<0,1 UFC/m <sup>3</sup>
<i>Cladosporium</i> sp	  <p><b>C. macroscópicas:</b> Las colonias son de crecimiento más lento, sobre todo-olivaceous marrón a marrón negruzco, pero también a veces gris, piel de ante o marrón, con frecuencia se vuelve polvo debido a la producción de abundantes conidios.</p> <p><b>C. microscópicas:</b> Conidióforos ovoidales, dispuestos en largas cadenas.</p>	<0,1 UFC/m <sup>3</sup>
<i>Fusarium</i> spp	  <p><b>C. macroscópicas:</b> Colonias algodonosas de inicio blanco que se torna de color morado.</p> <p><b>C. microscópicas:</b> Hifas hialinas septadas y delgadas, abundantes macroconidias fusiformes y septadas, escasas microconidias, eliptoidales.</p>	<0,1 UFC/m <sup>3</sup>

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:


<i>Aspergillus flavus.</i>	 	<p><b>C. macroscópicas:</b> Colonias de crecimiento lento, inicialmente algodonosa blanca luego se torna pulverulenta gruesa de color verde amarillento, que con el tiempo se trona café.</p> <p><b>C. microscópicas:</b> Conidioforos hialinos de pared rugosa. Cabezuela radiada, biseriada, vesículas esféricas. Conidias equinuladas, esféricas.</p>	$<0,1 \text{ UFC/m}^3$
----------------------------	--	--	------------------------

**Fuente:** (Tangarife, V. 2011).

**Anexo 3.** Resultados de las placas petrifilm para recuentos de aerobios

Características	Gráfico	Unidades hasta 100 UFC/m <sup>3</sup>
Placa Petrifilm Recuento de Aerobios sin colonias		Recuento 0 Rango de recuento 10 - 300 colonias. Recuento incontable
Crecimiento puede virar al rosa.		Número de colonias es superior a 300 colonias. Contar una de las cuadrículas (1 cm <sup>2</sup> ) y multiplicar por 20. El área de inóculo de una placa Petrifilm de Aerobios es de 20 cm <sup>2</sup> aproximadamente.

**Fuente:** (Guías Petrifilm)

	<b>LABORATORIO CLÍNICO "AMBALAB"</b>	<b>Manual de Microbiología</b>
	Fecha de aprobación:	Aprobado por:

## 1.7. REFERENCIAS

- ✓ Arriola, L. (2012). *Validación de métodos analíticos, fisicoquímicos y microbiológicos*. Recuperado el 12 de marzo del 2014, disponible en [http://www.medicamentos.com.gt/Archivos/Descargas/Curso\\_Validaci%C3%B3n\\_de\\_M%C3%A9todos\\_Anal%C3%ADticos\\_con\\_formulas.pdf](http://www.medicamentos.com.gt/Archivos/Descargas/Curso_Validaci%C3%B3n_de_M%C3%A9todos_Anal%C3%ADticos_con_formulas.pdf)
- ✓ Cercenado, E.; Cantón, R. (2009). *Recomendaciones para la implantación de la normativa de calidad ISO 15189 en el Laboratorio de Microbiología Clínica: bacteriología y serología, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Recuperado el 15 de marzo del 2014, disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia32.pdf>
- ✓ Gegmic, A. (2004). *Recomendaciones Generales para el Control de Calidad Interno en Microbiología Clínica*. Recuperado el 13 de junio del 2013, disponible en [https://www.google.com/url?q=http://www.seimc.org/grupos/gegmic/fuentes/gegmic\\_dyc1\\_2004.pdf&sa=U&ei=DT8ZUpnuHKHZ2AWLroHQBQ&ved=0CAcQFjAA&usg=AFQjCNGS7H-aC5DyVNziszQOEmwiwimT-w](https://www.google.com/url?q=http://www.seimc.org/grupos/gegmic/fuentes/gegmic_dyc1_2004.pdf&sa=U&ei=DT8ZUpnuHKHZ2AWLroHQBQ&ved=0CAcQFjAA&usg=AFQjCNGS7H-aC5DyVNziszQOEmwiwimT-w)
- ✓ Gómez, K. *Control de Calidad en Microbiología*. Recuperado el 04 de enero del 2014, disponible en [http://www.slideshare.net/SandraCruzGuerrero/control-de-calidad-en-microbiologia?utm\\_source=slideshow02&utm\\_medium=ssemail&utm\\_campaign=share\\_slideshow](http://www.slideshare.net/SandraCruzGuerrero/control-de-calidad-en-microbiologia?utm_source=slideshow02&utm_medium=ssemail&utm_campaign=share_slideshow)
- ✓ Quiroz, M. (2012). *Manual de Procedimientos del Laboratorio Docente de Microbiología Clínica en Base a la Normativa Iso 9001:2008*. Recuperado el 20 de diciembre del 2013, disponible en <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/972>
- ✓ Prat, S. *Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana por difusión en agar*. Recuperado el 25 de abril del 2014, disponible en [http://www.ispch.cl/lab\\_sal/doc/manual\\_susceptibilidad.pdf](http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf)
- ✓ Villamar, C. (2009). *Control de Calidad Interno en Microbiología*. Recuperado el 20 de noviembre del 2013, disponible en <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/manual%20practicas%20micagral.pdf>

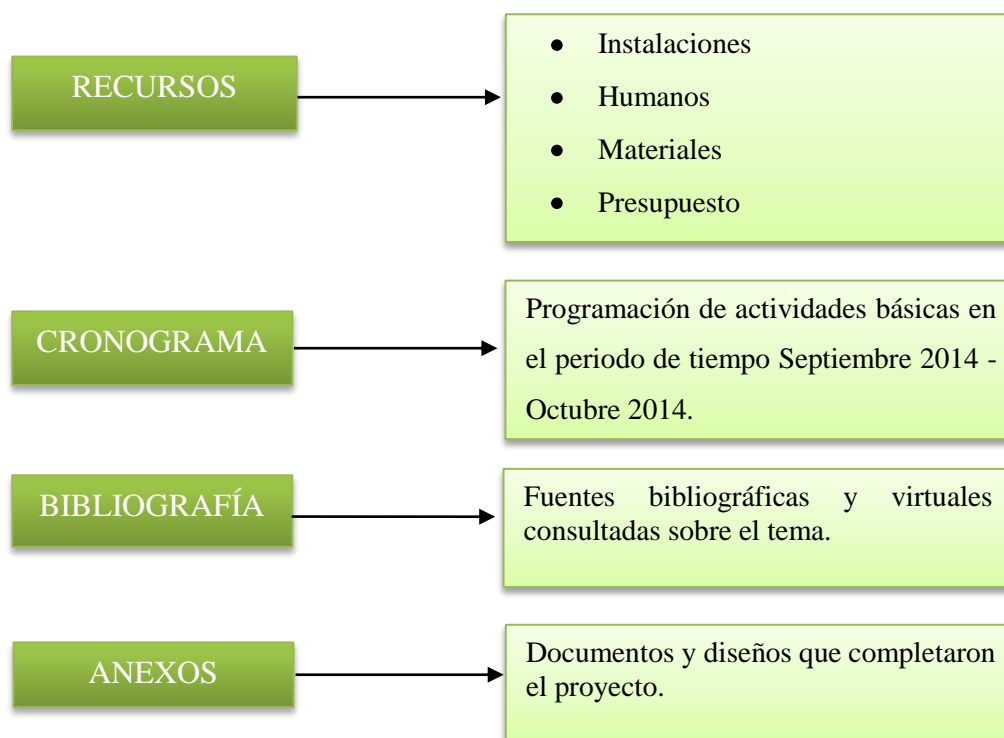
### 6.8. METODOLOGÍA- MODELO OPERATIVO

FASE	METAS	ACTIVIDADES	RECURSOS-TIEMPO	RESPONSABLE
Delimitación del procedimiento	Delimitar el ámbito de estudio que se va a realizar.	Definir el procedimiento que se va a realizar. Donde inicia y donde termina.	Durante el tiempo permisible.	Investigadora.
Recolección de la información	Recabar documentos y datos, tanto virtual como bibliográfica, que den a conocer los procesos y establecer los ajustes necesarios.	Técnicas que usualmente se utilizan: Investigación documental y observación de campo.	Durante el tiempo permisible.	Investigadora.
Análisis de la información	Se procede a seleccionar y estudiar cada uno de los elementos más importantes que constan en el manual.	Responderse interrogantes como ¿Qué trabajo se hace?, ¿Quién lo hace?, ¿Cuándo se hace?, ¿Dónde se hace?	Durante el tiempo permisible	Investigadora.
Estructuración del manual	Definir los elementos que integran el manual de procedimientos para cumplir con los objetivos.	Presentar de forma sintética y ordenada tomando en cuenta además la redacción y formatos que constan en el manual.	Durante el tiempo permisible.	Investigadora.
Evaluación	Validar que la información éste acorde con las actividades llevadas a cabo en el área.	Los responsables del área serán los que validen dicho manual.	Durante el tiempo permisible	Investigadora.

**Elaborado por:** Pamela Acosta



## 6.9. ADMINISTRACIÓN



## 6.10. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Después de la aportación del manual con información con respecto al estudio que fue realizado se podría reproducir el mismo ensayo dentro del laboratorio para fomentar una mejora continua de los métodos realizados dentro del área de microbiología.

## ANEXOS

### Anexo 1. GRÁFICOS



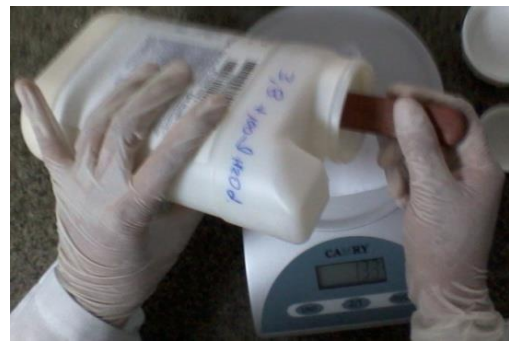
**GRÁFICO 1:** Monitoreo de la temperatura por termohigrómetro



**GRÁFICO 2:** Estudio del área de trabajo



**GRÁFICO 5:** Verificación del autoclave con cinta testigo



**GRÁFICO 6:** Preparación de los agares y pruebas bioquímicas



**GRÁFICO 7:** Calentamiento del agar.



**GRÁFICO 8:** Esterilización de los medios de cultivos.



**GRÁFICO 9:** Enfriamiento de agares



**GRÁFICO 10:** Cepa control *E. coli* ATCC 11775



**GRÁFICO 11:** Tubos con 9 mL de agua peptonada



**GRÁFICO 1:** Toma 1mL de cepa de control ATCC



**GRÁFICO 11:** Adición de 1mL de la cepa control ATCC en el primer tubo



**GRÁFICO 12:** Tubo de dilución  $10^{-1}$



**GRÁFICO 13:** Adición de 1 mL en las caja Petri.



**GRÁFICO 14:** Adición de agar Agar Sangre y Mac-Conkey



**GRÁFICO 15:** Adición de Agar Mueller-Hinton y Sabraud



**GRÁFICO 16:** Homogenización de los medios y solidificación.



**GRÁFICO 17:** Incubación los medios a las condiciones adecuadas.



**GRÁFICO 18:** Resultados de las placas petrifilm antes de la desinfección



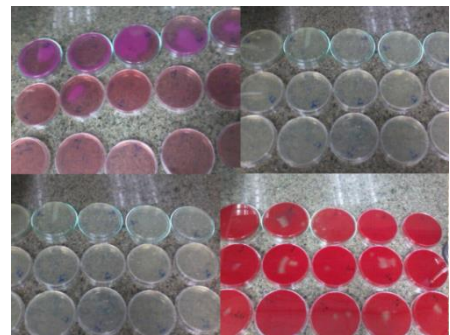
**GRÁFICO 19:** Resultados de las placas petrifilm después de la desinfección



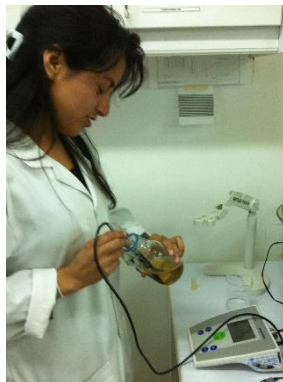
**GRÁFICO 20:** Resultados del estudio ambiental en Agar Sabouraud



**GRÁFICO 21:** Contaminación de placas en incubadora y ambiente.



**GRÁFICO 22:** Resultados de Agar Mueller-Hinton Saburaud, Sangre y Mac-Conkey



**GRÁFICO 23:** Estudio de pH de los medios de cultivos.



**GRÁFICO 24:** Dilución  $10^{-1}$  de Agar Mac-Conkey



**GRÁFICO 25:** Dilución  $10^{-2}$  de Agar Mac-Conkey



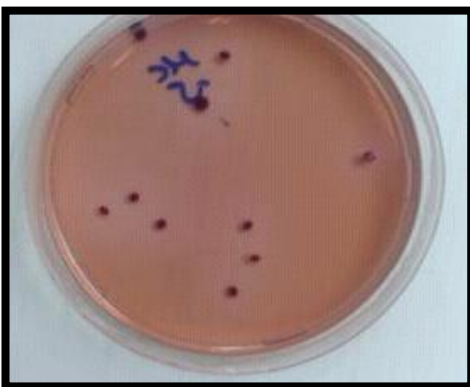
**GRÁFICO 26:** Dilución  $10^{-3}$  de Agar Mac-Conkey



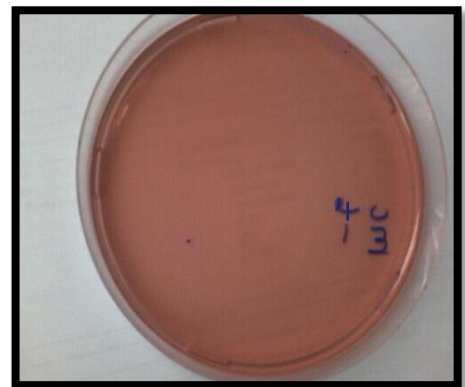
**GRÁFICO 27:** Dilución  $10^{-4}$  de Agar Mac-Conkey



**GRÁFICO 28:** Dilución  $10^{-5}$  de Agar Mac-Conkey



**GRÁFICO 29:** Dilución  $10^{-6}$  de Agar Mac-Conkey



**GRÁFICO 30:** Dilución  $10^{-7}$  de Agar Mac-Conkey



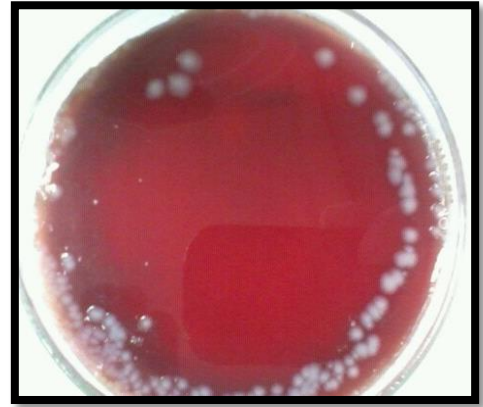
**GRÁFICO 31:** Dilución  $10^{-1}$  de Agar Sangre



**GRÁFICO 32:** Dilución  $10^{-2}$  de Agar Sangre



**GRÁFICO 33:** Dilución  $10^{-3}$  de Agar Sangre



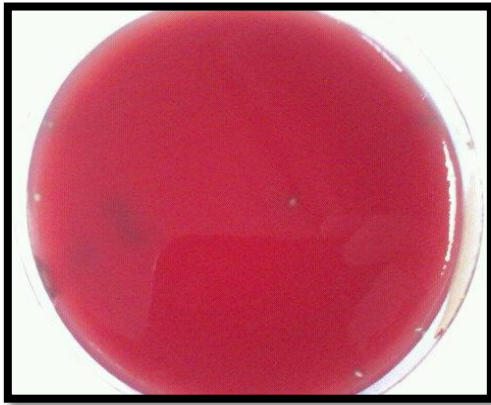
**GRÁFICO 34:** Dilución  $10^{-4}$  de Agar Sangre



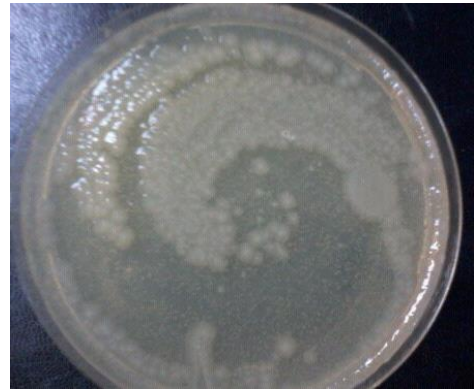
**GRÁFICO 35:** Dilución  $10^{-5}$  de Agar Sangre



**GRÁFICO 36:** Dilución  $10^{-6}$  de Agar Sangre



**GRÁFICO 37:** Dilución  $10^{-7}$  de Agar Sangre



**GRÁFICO 38:** Dilución  $10^{-1}$  de Agar Mueller-Hinton



**GRÁFICO 39:** Dilución  $10^{-2}$  de Agar Mueller-Hinton



**GRÁFICO 40:** Dilución  $10^{-3}$  de Agar Mueller-Hinton



**GRÁFICO 41:** Dilución  $10^{-4}$  de Agar Mueller-Hinton

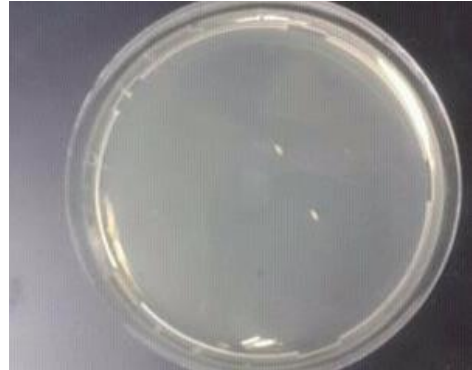


**GRÁFICO 42:** Dilución  $10^{-5}$  de Agar Mueller-Hinton

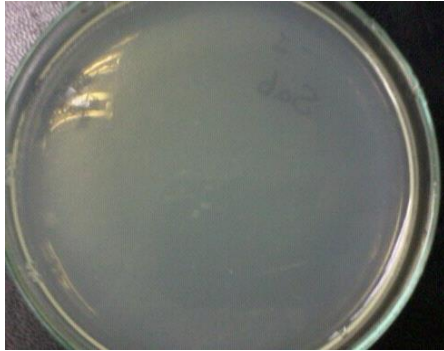




**GRÁFICO 43:** Dilución  $10^{-6}$  de Agar Mueller-Hinton



**GRÁFICO 44:** Dilución  $10^{-7}$  de Agar Mueller-Hinton



**GRÁFICO 45:** Dilución  $10^{-1}$  de Agar Saboraud

## **BIBLIOGRAFÍA:**

Bailey, Scott. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Edición Médica Panamericana, pp 915-932.

Patrick R. (2009). *Microbiología Clínica*. 6a. ed. Barcelona, España. pp 221-222.

Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. 5a. ed. Buenos, Aires-Bogotá-Caracas. pp 227-228.

## **LINKOGRAFÍA**

Arriola, L. (2012). *Validación de métodos analíticos, fisicoquímicos y microbiológicos*. Recuperado el 12 de marzo del 2014, disponible en [http://www.medicamentos.com.gt/Archivos/Descargas/Curso\\_Validaci%C3%B3n\\_de\\_M%C3%A9todos\\_Anal%C3%ADticos\\_con\\_formulas.pdf](http://www.medicamentos.com.gt/Archivos/Descargas/Curso_Validaci%C3%B3n_de_M%C3%A9todos_Anal%C3%ADticos_con_formulas.pdf)

Bazurto, C. (2012). *Normas de Bioseguridad Aplicadas por el Personal del Laboratorio Clínico y su Relación con los Riesgos de Infección en el Hospital Verdi Cevallos de Portoviejo*. Recuperado el 22 de abril del 2013, disponible en <http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/123456789/582/1/FCSTGLLC2012-0031.pdf>

Cabeza, E. (2013). *Fundamento de microbiología predictiva; aplicaciones teóricas y prácticas*. Recuperado el 23 de junio del 2014, disponible en: [http://www.academia.edu/2766150/Introducci%C3%B3n\\_a\\_la\\_Microbiolog%C3%ADa\\_Predictiva\\_-\\_Manual\\_de\\_pr%C3%A1cticas\\_de\\_laboratorio](http://www.academia.edu/2766150/Introducci%C3%B3n_a_la_Microbiolog%C3%ADa_Predictiva_-_Manual_de_pr%C3%A1cticas_de_laboratorio)

Callejas, L. (2009). *Verificación de Procesos de Limpieza y Desinfección de los Laboratorios: Aguas y Lodos, Inmunología Especializada y Citometría de Flujos, Microbiología de los Alimentos, Microbiología Ambiental y De Suelos*. Recuperado el 27 noviembre del 2013, disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis214.pdf>

Cassola, A. *Ley Reglamentos sobre Laboratorios de Diagnóstico Clínico*. Recuperado el 02 de abril del 2013, disponible en [https://www.google.com/url?q=http://www.lexis.com.ec/Webtools/Biblioteca\\_Sil ec/Documentos/Lexis/DocsInvestJurid/Proyecto%2520de%2520Ley%2520de%2 520Laboratorios%2520Cl%25C3%25ADnicos.pdf&sa=U&ei=nLYiUuyFLaa8sQS R14GwCw&ved=0CAcQFjAA&usg=AFQjCNEO33NJXuOgM\\_3FJyDJvn1PdeR BzQ](https://www.google.com/url?q=http://www.lexis.com.ec/Webtools/Biblioteca_Sil%20ec/Documentos/Lexis/DocsInvestJurid/Proyecto%2520de%2520Ley%2520de%2520Laboratorios%2520Cl%25C3%25ADnicos.pdf&sa=U&ei=nLYiUuyFLaa8sQSR14GwCw&ved=0CAcQFjAA&usg=AFQjCNEO33NJXuOgM_3FJyDJvn1PdeRBzQ)

Cuesta, A. (2012). *Aseguramiento de la calidad y validación de metodologías para el análisis microbiológico NORMA ISO 17025*. Recuperado el 15 de junio del 2014, disponible en [http://www.inti.gov.ar/redaloa/pdf/Taller3REDALOA\\_validacion\\_metodos\\_micr obiológicos.pdf](http://www.inti.gov.ar/redaloa/pdf/Taller3REDALOA_validacion_metodos_micr obiológicos.pdf)

Cercenado, E.; Cantón, R. (2009). *Recomendaciones para la implantación de la normativa de calidad ISO 15189 en el Laboratorio de Microbiología Clínica: bacteriología y serología, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Recuperado el 15 de marzo del 2014, disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiol ogia/seimc-procedimientomicrobiologia32.pdf>

Delgado, M. (2009). *Control de calidad interno en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Dr. Miguel Enríquez*. Recuperado el 17 de marzo del 2013, disponible en <http://www.contactoquimico.com/pdf/ContactoQuimicoNo-14.pdf>

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. (2009). *Calidad en el Laboratorio de Análisis Clínicos*. Recuperado el 13 de febrero del 2014, disponible en [http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/103597/mod\\_resource/conten t/1/Calidad%20en%20lab%20clinico.pdf](http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/103597/mod_resource/conten t/1/Calidad%20en%20lab%20clinico.pdf)

Gallegos, F. (2009). *La Infraestructura del Área de Laboratorio Clínico del Hospital Provincial General Docente Ambato influye en la Proliferación de Enfermedades Infectocontagiosas*. Recuperado el 22 de junio del 2013, disponible en [http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/1623/PSIN\\_03.pdf?sequence=1](http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/1623/PSIN_03.pdf?sequence=1)

Gegmic, A. (2004). *Recomendaciones Generales para el Control de Calidad Interno en Microbiología Clínica*. Recuperado el 13 de marzo del 2013, disponible en [https://www.google.com/url?q=http://www.seimc.org/grupos/gegmic/fuentes/gegmic\\_dyc1\\_2004.pdf&sa=U&ei=DT8ZUpnuHKHZ2AWLroHQBQ&ved=0CAcQFjAA&usg=AFQjCNGS7H-aC5DyVNziszisQOEmwiwimT-w](https://www.google.com/url?q=http://www.seimc.org/grupos/gegmic/fuentes/gegmic_dyc1_2004.pdf&sa=U&ei=DT8ZUpnuHKHZ2AWLroHQBQ&ved=0CAcQFjAA&usg=AFQjCNGS7H-aC5DyVNziszisQOEmwiwimT-w)

Gómez, C. (2013). *Calidad en la recogida de muestras microbiológicas en la Unidad de Urgencias de Pediatría del Hospital Universitario Central de Asturias*. Recuperado el 14 de julio del 2013, disponible en [http://dspace.sheol.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/20371/3/TFM\\_Gomez%20Morales.pdf](http://dspace.sheol.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/20371/3/TFM_Gomez%20Morales.pdf)

Hinostroza, M. (2012). *Mejoramiento de la calidad del laboratorio clínico del Hospital Enrique Sotomayor. Guayaquil*. Recuperado el 17 mayo del 2013, disponible en <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/6974>

INFORMAWORLD. Barrow, P. (2007). *Salmonella control—past, present and future*. Recuperado el 20 de junio del 2014, disponible en [http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079459308418954#.VA8JpMJ\\_tic](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079459308418954#.VA8JpMJ_tic)

INFORMAWORLD. García, E.; Gayosso, A.; Castro, M.; Nicoli, M. (2009). *Amplificación múltiple de ADN para la detección de Escherichia coli O157:H7 y Salmonella spp. en canales de bovino*. Recuperado el 25 de junio

del 2014, disponible en [http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/11358120902850651#.VA8LM8J\\_tic](http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/11358120902850651#.VA8LM8J_tic)

INFORMAWORLD. Vendrell, M.; Sinde, E.; Torres, M.; (2009). *Estudio de microorganismos patógenos en la fuente termal de o tinteiro en ourense*. Recuperado el 20 de junio del 2014, disponible en <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11358129809487587>

Instituto de Salud Pública. *Procedimiento evaluación de medios de cultivos*. Recuperado el 29 de febrero del 2014, disponible en [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2011/11/PRT-712.00-105%20V2%20Evaluaci%C3%B3n%20medios%20cultivo%20ISO%2011133.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2011/11/PRT-712.00-105%20V2%20Evaluaci%C3%B3n%20medios%20cultivo%20ISO%2011133.pdf)

López, J. (2007). *Actualización de la Fase Preanalítica de los Laboratorios Clínicos del Hospital Cruz Roja*. Recuperado el 18 de mayo del 2013, disponible en <https://www.google.com/url?q=http://www.ingesa.msc.es/estadEstudios/documPublica/pdf/actualzFasePreanalitica.pdf&sa=U&ei=c14iUtkmsa6xBLEegNAM&ved=0CAsQFjACOB4&usg=AFQjCNGUjLlh2LqZ0z-B4elTie-6dNkrcQ>

Martínez, J. (2008). *Lineamiento para la adecuada toma de muestras que serán enviadas al Laboratorio*. Recuperado el 14 de octubre del 2013, disponible en [http://www.iner.salud.gob.mx/descargas/manuales/lineamientos/dirmedica/Lineamientos\\_toma\\_muestras.pdf](http://www.iner.salud.gob.mx/descargas/manuales/lineamientos/dirmedica/Lineamientos_toma_muestras.pdf)

Ministerio de Salud Pública. (2012). *Permiso de Funcionamiento*. Recuperado el 06 de mayo del 2013, disponible en <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&ved=0CDUQFjAC&url=http%3A%2F%2Finstituciones.msp.gob.ec%2Fdps%2Ftungurahua%2Findex.php>

Mostorino, R. (2005). *Bioseguridad en laboratorios de ensayos, biomédicos y clínicos*. Recuperado el 13 de agosto del 2013, disponible en <http://bvcentadim.digemid.minsa.gob.pe/files/publicaciones/manuales/BIOSEGURIDAD%20EN%20LABORATORIOS%20DE%20ENSAYOS%20BIOMEDICOS%20Y%20CLINICO.pdf>

Ortíz, D. (2008). *Validación e implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica*. Recuperado el 15 de junio del 2014, disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis109.pdf>

Peñas, M. (2009). *Microbiología Clínica*. Recuperado el 16 de abril del 2014, disponible en <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/practicass.pdf>

Quiroz, M. (2012). *Manual de Procedimientos del Laboratorio Docente de Microbiología Clínica en Base a la Normativa Iso 9001:2008*. Recuperado el 20 octubre del 2013, disponible en <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/972>

SPRINGER LINK. Muñoz, E.; Gómez, B. (2013). *La actividad antimicrobiana, los factores de susceptibilidad a los antibióticos y la virulencia de las bacterias del ácido láctico de origen acuático destinados a ser utilizados como prebióticos en la agricultura*. Recuperado el 23 de junio del 2014, disponible en <http://link.springer.com/article/10.1186/1471-2180-13-15>

SPRINGER LINK. Brandão, A.; Almeida, T.; Muñoz, E. (2010). *La actividad antimicrobiana y la aparición de los genes estructurales de bacteriocina en Enterococcus spp. de origen humano y animal aislado en Portugal*. Recuperado el 22 de junio del 2014, disponible en <http://link.springer.com/article/10.1007/s00203-010-0619-z>

Velasco, J. Araque, M. Araujo E. (2008). *Manual Práctico de Bacteriología Clínica*. Recuperado el 20 de noviembre del 2013, disponible en <http://www.serbi.ula.ve/serbiula/librose/pva/Libros%20de%20PVA%20para%20libro%20digital/Manual%20de%20Bacteriologia.pdf>

Villamar, C. (2009). *Control de calidad interno en Microbiología*. Recuperado el 23 de diciembre del 2013, disponible en <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/manual%20practicass%20micagral.pdf>

WHO. (2003). *Prácticas de Seguridad Estándar en el Laboratorio de Microbiología*. Recuperado el 16 de abril del 2013, disponible en [http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO\\_CDS\\_CSR\\_RMD\\_2003.6\\_apendices\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_RMD_2003.6_apendices_spa.pdf)