

***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS***

***Y***

***CONTROL DE CALIDAD***

# **INDICE GENERAL**

<b>CONTROL DE CALIDAD DE PRUEBAS BIOQUIMICAS</b>	<b>6</b>
Prueba de la Beta-galactosidasa	6
Test de utilizacion de azucares	6
Test de decarboxilasa-dihidrolasa	7
Prueba del malonato	7
Ensayo del rojo de metilo	8
Ensayo de Voges-Proskauer	8
Agar hierro tres azucares (tsi) y agar Kligler	9
Agar lisina hierro (LIA)	10
Cuadro resumido de pruebas bioquímicas	11
TSI	11
LIA	11
<b>DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR METODO DE DIFUSION</b>	<b>12</b>
<b>PRINCIPIOS GENERALES</b>	<b>12</b>
<b>EL MÉTODO DE DIFUSIÓN</b>	<b>12</b>
<b>FUNDAMENTOS PARA LA INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL METODO DE DIFUSIÓN</b>	<b>12</b>
Drogas a ensayar	13
Medio de cultivo	13
Volumen	14
pH	14
<b>TABLA1:</b> Variación de la actividad de diferentes antimicrobianos con el cambio del pH	15
Humedad	15
Suplementos	15
Conservación de los discos	16
Inóculo	16
Patrón de turbidez	16
<b>TABLA 2:</b> Preparación de los estándares de McFarland	17
Preparación del inóculo	17
Inoculación de las placas	17
Aplicación de los discos de antibióticos en las placas inoculadas	18
Incubación	18
Lectura de las placas	18
<b>CONTROL DE CALIDAD</b>	<b>19</b>
Propósito	19
Cepas Control	19
<b>TABLA 3 :</b> Control de Calidad Interno	20
<b>TABLA 4:</b> Otros Controles de Calidad Interno	21
<b>CONTROL DE MEDIOS DE RUTINA Y REACTIVOS USADOS EN LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS</b>	<b>22</b>
Parámetros que se evalúan cuando se utilizan cepas de referencia para el control de calidad	22
Parámetros que no se evalúan eficientemente mediante el uso de cepas de referencia para control de calidad.	22
<b>TABLA 5:</b> Causas de resultados no concordantes con los valores esperados	23
Identificación bacteriana	24
Límites de los diámetros de la zona de inhibición	24
Frecuencia de las pruebas	24
Fuentes comunes de error en el método de difusión por discos	24
<b>LIMITACIONES DEL METODO DE DIFUSION POR DISCOS</b>	<b>25</b>
Grupos de microorganismos donde se puede aplicar la prueba de difusión por discos	25
Resultados incorrectos	25

Emergencia de resistencia	25
Medidas para asegurar un correcto control de calidad	25
<b>CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS Y LIQUIDOS</b>	<b>26</b>
Control de esterilidad	26
Control de pH	26
Control de la profundidad del agar	26
Contenido de Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup>	26
Contenido de timidina	27
Capacidad de los medios de cultivo de permitir el crecimiento bacteriano	27
Apariencia de los medios de cultivo	27
<b>TABLA 6:</b> Resistencias naturales en el género enterobacterias	28
<b>TABLA 7:</b> Resistencias naturales en bacilos gram negativos no fermentadores	29
<b>TABLA 8:</b> Resistencias naturales en cocos gram positivos	30
<b>CONTROL DE CALIDAD DEL INSTRUMENTAL EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA</b>	<b>31</b>
Recomendaciones generales	31
<b>pH-Metro</b>	<b>32</b>
Descripción	32
Utilización del pH-metro en microbiología	32
Ubicación en el laboratorio	32
Precauciones especiales	32
Materiales y reactivos necesarios	33
Procedimiento de calibración inicial	34
Periodicidad de los controles	35
Lavado y reacondicionamiento de los electrodos	36
Procedimientos para las mediciones especiales	36
Causas de mal funcionamiento	37
<b>PIPETAS</b>	<b>38</b>
Principio de funcionamiento	38
Descripción	38
Exactitud y precisión	38
Utilización de pipetas en microbiología	38
Factores de calibración	38
Métodos para la calibración de pipetas	39
Precauciones especiales	39
Condiciones ambientales para la calibración de pipetas	39
Frecuencia de calibración	39
Esquema de calibración sugerido para las pipetas utilizadas en el laboratorio de microbiología	40
Calibración por método gravimétrico	40
Materiales e insumos	40
Procedimiento	41
Cálculos	41
Tolerancia	41
Límites de tolerancia sugeridos para pipetas utilizadas en microbiología	42
Valores de Z en función de la temperatura y la presión para agua destilada.	42
Planilla para Calibración de pipetas. Método Gravimétrico	43
<b>CONTROL DE AUTOCLAVE</b>	<b>44</b>
Principio y descripción	44
Consideraciones Generales y Precauciones Especiales	44
Insumos necesarios	45
Operación de Rutina	46
Control de Calidad y Mantenimiento.	47
<b>CENTRIFUGAS</b>	<b>47</b>
Principio y descripción	47
Precauciones y Consideraciones	48

Calibración Inicial	49
Control de Calidad	49
Operación de rutina	50
<b>CABINA DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>50</b>
Principio y descripción	50
Principio	50
Clases de Cabinas de Bioseguridad	51
Principio de Cabinas de flujo laminar de Clase II	52
Utilidad en el Laboratorio de Microbiología	53
Limitaciones	54
Precauciones	54
Materiales	55
Instalaciones y certificación	55
Control de Calidad	55
Uso de Rutina	56
Selección de una cabina de bioseguridad	57
<b>HELADERAS Y CONGELADORES (FREEZERS)</b>	<b>57</b>
Especificaciones Ambientales	57
Precauciones Especiales	58
Calibración Inicial	58
Calibración De Rutina	59
<b>PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN DE TERMÓMETROS</b>	<b>59</b>
Método de Calibración	59
Cálculo del Factor de Corrección	59
<b>ESTUFAS</b>	<b>60</b>
Estufas de aire (GAS)	60
Estufas de CO <sub>2</sub>	61
Control de calidad de rutina	61
Procedimientos especiales	62
<b>Formulario para el Control de Calidad de la Preparación del Medio de Cultivo</b>	<b>63</b>
<b>Formulario para el Control de Calidad de las Heladeras y Congeladores (freezers)</b>	<b>65</b>
<b>Formulario para el Registro de Control de Calidad del ph-metro</b>	<b>66</b>
<b>Formulario de Registro para el Control de Calidad de Estufas de Cultivo</b>	<b>68</b>
<b>Formulario para el Control del Autoclave</b>	<b>69</b>
<b>Formulario para el Control de la Cabina de Bioseguridad</b>	<b>70</b>
Equipos, Mediciones y Controles	71
Bibliografía	72

El presente manual de procedimientos consta de dos secciones. En la primera se detallan los lineamientos para la realización de las pruebas de sensibilidad por difusión y su correspondiente control de calidad basado en las normas NCCLS y en la segunda sección se presenta la descripción del funcionamiento, mantenimiento y control de calidad de los instrumentos que se utilizan con más frecuencia en el laboratorio de microbiología. Esta última sección se basa en el Clinical Microbiology Procedures Handbook editado por American Society for Microbiology (ASM).

El objetivo de este manual es brindar información para que contribuya a la preparación de manuales de procedimientos y control de calidad propios de cada laboratorio de microbiología.

# CONTROL DE CALIDAD DE PRUEBAS BIOQUIMICAS

Raquel Terragno

Servicio Enterobacterias – Departamento Bacteriología – INEI – ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”

## PRUEBA DE LA BETA-GALACTOSIDASA

### I. Principio

La fermentación de la lactosa requiere dos enzimas; mientras la permeasa facilita la penetración de la molécula de lactosa dentro de la célula bacteriana, la  $\beta$ -galactosidasa hidroliza la lactosa para formar galactosa y glucosa. Las bacterias no fermentadoras de lactosa carecen de ambas enzimas, sin embargo hay bacterias que tienen  $\beta$ -galactosidasa pero no permeasa. El o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG) es un compuesto incoloro estructuralmente similar a la lactosa. En presencia de  $\beta$ -galactosidasa, ONPG se rompe en galactosa y o-nitrofenil, un compuesto color amarillo. Como la familia *Enterobacteriaceae* se agrupan de acuerdo a su habilidad de fermentar lactosa, este test es útil en la identificación de fermentadores de lactosa.

### II. Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de color amarillo.

Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

### III. Control de calidad

*Escherichia coli* +

*Salmonella* (-)

## TEST DE UTILIZACION DE AZUCARES

### I. Principio

Es un ensayo para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar un hidrato de carbono con producción de ácido o ácido y gas. El patrón de utilización de azúcares ayuda en la diferenciación e identificación de muchas bacterias. En este ensayo, determinados azúcares se agregan a un medio basal estéril. La producción de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador. La elección del medio y del indicador dependen del camino metabólico del organismo y de la claridad visual del cambio de pH.

### II. Resultados

Ensayo positivo: viraje del indicador al rojo-rosado por acidificación del medio.

Ensayo negativo: no hay cambio de color.

### III. Control de calidad

Con distintos microorganismos que fermenten los azúcares, como por ejemplo:

*Escherichia coli*: glucosa +

*Klebsiella*: lactosa +

*Yersinia enterocolitica*: sacarosa +

## TEST DE DECARBOXILASA-DIHIDROLASA

### I. Principio

La descarboxilación es un proceso en el cual las decarboxilasas atacan el extremo carboxilo de los aminoácidos, formando la correspondiente amina. Los tres aminoácidos que se ensayan en la identificación de Enterobacterias son arginina, lisina y ornitina. La descarboxilación de lisina y ornitina da cadaverina y putrescina (diaminas), mientras que arginina da citrulina por acción de una dihidrolasa. El test se debe acompañar con un tubo control que contiene el medio base sin aminoácido. Como la descarboxilación es una reacción anaeróbica, se debe cubrir el medio con una capa de aceite mineral estéril. El proceso ocurre en dos etapas: por fermentación de la glucosa se produce una acidificación del medio (pH < 6.0), apareciendo color amarillo. La acidificación es necesaria para que ocurra la descarboxilación. Este último proceso de lugar a la formación de las aminas que elevan el pH con el consiguiente viraje del indicador al color violeta.

La prueba de la lisina ayuda en la diferenciación de *Edwardsiella* (+), y *Salmonella* (+) de *Citrobacter* (-); de *Enterobacter aerogenes* (+) de *Enterobacter cloacae* (-) y *Enterobacter agglomerans* (-)

La prueba de ornitina ayuda a diferenciar *Klebsiella* (-), *Proteus mirabilis* (+) de *Proteus vulgaris* (-); *Morganella morganii* (+) de *Providencia rettgeri* (-); *Yersinia enterocolitica* (+) de *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis* (-).

### II. Resultados

Ensayo positivo: medio turbio y púrpura a púrpura amarillento.

Ensayo negativo: color amarillo

Tubo control: permanece con su color original o se vuelve amarillo si el organismo es un fermentador de glucosa (se debe ver turbidez en el tubo).

### III. Control de calidad

BACTERIA	ARGININA	LISINA	ORNITINA
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	+	+
<i>Salmonella Typhimurium</i>	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	-	+	-

## PRUEBA DEL MALONATO

### I. Principio

El ensayo pone en evidencia la capacidad de las bacterias de utilizar malonato como fuente de carbono. Las cantidades mínimas de glucosa del medio, permiten el desarrollo de organismos que no pueden usar malonato o sales de amonio, sin embargo esos organismos no pueden mantener un pH alcalino. La producción de ácido por la fermentación de la glucosa impide una posible alcalinización. Solamente los microorganismos que pueden usar simultáneamente malonato de sodio como fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno son capaces de ejercer una acción buffer produciendo hidróxido de sodio. El aumento de la alcalinidad resultante hace que el azul de bromotimol cambie de verde a azul. Los microorganismos malonato negativos que fermentan glucosa hacen que el indicador cambie de verde a amarillo. La mayoría de las especies de *Enterobacter* y *Klebsiella* utilizan malonato de sodio. El ensayo también sirve para separar *Salmonella arizonae* (+) de otras especies de *Salmonella* (-).

## II. Resultados

Ensayo positivo: reacción alcalina (azul).

Ensayo negativo: no hay cambio de color (verde).

Ensayo negativo: reacción ácida, sólo fermentación de glucosa (amarillo).

## III. Control de Calidad

*Enterobacter aerogenes* +

*Escherichia coli* -

## ENSAYO DEL ROJO DE METILO

### I. Principio

El test se usa para determinar la presencia de iones hidrógeno cuando un microorganismo fermenta glucosa. Todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* convierten glucosa en ácido pirúvico por el camino de Embden-Meyerhof. Los organismos que metabolizan ácido pirúvico producen ácido y bajan el pH a menos de 4.4. Los organismos que utilizan, en cambio, el camino del butilenglicol producen acetoína y butanodiol (diacetilo). El indicador del medio, rojo de metilo, es rojo a pH < 5.0 y amarillo a pH > 5.8. El test es útil para la diferenciación de *Escherichia coli* (rojo metilo positivo) de *Klebsiella* (rojo metilo negativo). La mayoría de las *Enterobacteriaceae* tienen uno u otro camino metabólico, pero raramente ambos.

### II. Resultados

Ensayo positivo: el reactivo permanece rojo.

Ensayo negativo: el reactivo se torna amarillo-naranja.

Si el resultado es negativo continuar la incubación de la bacteria por 24 horas más.

### III. Control de Calidad

*Escherichia coli* +

*Enterobacter aerogenes* -

## ENSAYO DE VOGES-PROSKAUER

### I. Principio

El piruvato es un intermediario en el metabolismo de la glucosa. A partir del ácido pirúvico un microorganismo puede seguir varios caminos. Algunos lo rompen para formar como productos finales ácidos láctico, acético o fórmico. Otros metabolizan el piruvato por el camino del butilenglicol para formar como productos finales acetoína (acetilmetilcarbinol) y 2,3-butanodiol (diacetilo). El ensayo de Voges-Proskauer (VP) detecta estos productos metabólicos. En presencia de oxígeno e KOH, la acetoína se oxida a diacetilo, que da un complejo rojo. La sensibilidad del ensayo se aumenta por el agregado de  $\alpha$ -naftol antes del agregado de KOH.

### II. Resultados

Ensayo positivo: desarrollo de color rojo dentro de los 15 minutos.

Ensayo negativo: no hay desarrollo de color.

### III. Control de Calidad

*Klebsiella pneumoniae* –  
*Escherichia coli* +

## AGAR HIERRO TRES AZUCARES (TSI) Y AGAR KLIGLER

### I. Principio

El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>). El medio contiene 1 parte (0.1%) de glucosa y 10 partes (1.0%) de lactosa y sacarosa. El indicador de pH es el rojo fenol y el sulfato ferroso pone en evidencia la formación de SH<sub>2</sub>. Si el microorganismo fermenta glucosa, tanto la punción como la estría aparecerán de color amarillo. Si el organismo fermenta lactosa y/o sacarosa, la estría permanecerá ácida (amarilla). Si no fermenta lactosa, la estría se vuelve alcalina (roja). Los organismos que no fermentan glucosa no producen cambios en el pH del medio o producirán productos alcalinos y el medio TSI permanecerá rojo. La producción de SH<sub>2</sub> se manifiesta por un ennegrecimiento del medio.

El agar de Kligler contiene dos azúcares: lactosa (1%) y glucosa (0.1%). Este medio puede reemplazar al TSI, la diferencia entre ambos es la ausencia de sacarosa. Los fundamentos bioquímicos y la interpretación de los resultados son los mismos para ambos medios.

### II. Resultados

- A. Estría ácida/fondo ácido (amarillo/amarillo): fermentación de glucosa, sacarosa y/o lactosa (*E. coli*).
- B. Estría alcalina/fondo ácido (rojo/amarillo): fermentación de glucosa solamente (*Shigella* spp.).
- C. Estría alcalina/fondo alcalino (rojo/rojo): no fermentador (*Pseudomonas aeruginosa*).
- D. Precipitado negro en el fondo: producción de SH<sub>2</sub> (*Salmonella* spp.).
- E. Burbujas o roturas: producción de gas (*E. coli*, *Salmonella* spp.).

### III. Control de Calidad

BACTERIA	PUNCION	ESTRI A	SH2
<i>Salmonella</i> Typhi	Ac	Alc	+ (*)
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	Ac/g	Alc	-
<i>Salmonella</i> sp.	Ac	Alc	+
<i>Shigella</i> sp.	Ac	Alc	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ac/g	Ac	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ac/g	Ac	-
<i>Escherichia coli</i>	Ac/g	Ac	-
<i>Citrobacter</i> sp.	Ac/g	Ac	+
<i>Klebsiella</i> sp.	Ac/g	Ac	-
<i>Proteus vulgaris</i>	Ac/g o Ac	Ac	+(sucio)
<i>Proteus mirabilis</i>	Ac/g o Ac	Alc	+ (sucio)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ac/g o Ac	Alc	-

(\*) sólo en la parte superior de la punción o formación de un anillo.

## AGAR LISINA HIERRO (LIA)

### I. Principio

La descarboxilación de la lisina a cadaverina produce una alcalinización del medio y un viraje al violeta del indicador púrpura de bromocresol. Como la reacción tiene lugar en medio ácido, es necesario la fermentación previa de la glucosa.

Los microorganismos que no descarboxilan lisina, pero fermentan la glucosa producen un viraje al amarillo en todo el medio.

La formación de SH<sub>2</sub> produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido.

Las bacterias del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de *Morganella morganii*, desaminan la lisina a ácido  $\alpha$ -cetocarbónico que forma compuestos pardo-rojizos en el medio de cultivo con la sal de hierro y en aerobiosis.

### II. Resultados

Los microorganismos que descarboxilan la lisina producen un viraje al violeta.

Los microorganismos que no descarboxilan la lisina y fermentan glucosa producen un viraje al amarillo.

La formación de SH<sub>2</sub> se indica por la aparición de una coloración negra.

### III. Control de Calidad

BACTERIA	PUNCIÓN	ESTRIA	SH <sub>2</sub>
<i>Salmonella</i> sp.	Violeta	Violeta	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Amarilla	Pardo-rojiza	+
<i>Proteus vulgaris</i>	Amarilla	Pardo-rojiza	+
<i>Morganella morganii</i>	Amarilla	Pardo-rojiza	-
<i>Prov. rettgeri</i>	Amarilla	Pardo-rojiza	-
<i>Providencia</i> sp.	Amarilla	Pardo-rojiza	-
<i>Citrobacter</i> sp.	Amarilla	Violeta	+
<i>Escherichia coli</i>	Amarilla	Violeta	-
<i>Shigella</i> sp.	Amarilla	Violeta	-
<i>Klebsiella</i> sp.	Violeta	Violeta	-

### CUADRO RESUMIDO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba Bioquímica	Control Positivo	Control Negativo	Resultado Positivo	Resultado Negativo
β-galactosidasa	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> sp.	Color amarillo	No desarrollo de color
Dulcita	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Morganella morganii</i>	Color rosado	Sin cambio de color
Malonato	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. coli</i>		
Rojo de metilo	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	Color rojo	Color amarillo
Voges-Proskauer	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	Anillo rojo	Sin anillo
Arginina	<i>E. cloacae</i> <i>E. aerogenes</i>	<i>Pr. vulgaris</i> <i>M. morganii</i>	Color violeta	Color amarillo
Lisina	<i>E. aerogenes</i>	<i>Pr. vulgaris</i> <i>M. morganii</i> <i>E. cloacae</i>	Color violeta	Color amarillo
Ornitina	<i>M. morganii</i> <i>E. cloacae</i> <i>E. aerogenes</i>	<i>Pr. vulgaris</i>	Color violeta	Color amarillo

### TSI

BACTERIA	PUNCIÓN	ESTRIA A	SH2
<i>Salmonella</i> Typhi	Ac	Alc	+ (*)
<i>Salmonella</i> Paratyphi A	Ac/g	Alc	-
<i>Salmonella</i> sp.	Ac	Alc	+
<i>Shigella</i> sp.	Ac	Alc	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ac/g	Ac	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ac/g	Ac	-
<i>Escherichia coli</i>	Ac/g	Ac	-
<i>Citrobacter</i> sp.	Ac/g	Ac	+
<i>Klebsiella</i> sp.	Ac/g	Ac	-
<i>Proteus vulgaris</i>	Ac/g o Ac	Ac	+(sucio)
<i>Proteus mirabilis</i>	Ac/g o Ac	Alc	+(sucio)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ac/g o Ac	Alc	-

(\*) sólo en la parte superior de la punción o formación de un anillo.

### LIA

BACTERIA	PUNCIÓN	ESTRIA	SH2
<i>Salmonella</i> sp.	Violeta	Violeta	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Amarilla	Pardo-rojiza	+
<i>Proteus vulgaris</i>	Amarilla	Pardo-rojiza	+
<i>Morganella morganii</i>	Amarilla	Pardo-rojiza	-
<i>Prov. Rettgeri</i>	Amarilla	Pardo-rojiza	-
<i>Providencia</i> sp.	Amarilla	Pardo-rojiza	-
<i>Citrobacter</i> sp.	Amarilla	Violeta	+
<i>Escherichia coli</i>	Amarilla	Violeta	-
<i>Shigella</i> sp.	Amarilla	Violeta	-
<i>Klebsiella</i> sp.	Violeta	Violeta	-

# DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR METODO DE DIFUSION

Marcelo Galas – Paola Ceriana

Servicio Antimicrobianos – Departamento Bacteriología – INEI – ANLIS "Dr. C. G. Malbrán"

## PRINCIPIOS GENERALES

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos evalúan la capacidad de un fármaco antibacteriano para inhibir *in vitro* el desarrollo bacteriano. Esta capacidad puede determinarse por el método de dilución o por el método de difusión.

Para evaluar en forma cuantitativa la actividad de un antibiótico se debe enfrentar el microorganismo problema a una serie de diluciones de la droga en estudio. La concentración más baja del antimicrobiano que impide el crecimiento bacteriano después de una noche de incubación se considera como la "concentración inhibitoria mínima" o CIM del fármaco.

## EL MÉTODO DE DIFUSIÓN

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel, pastillas con drogas en estado cristalino, etc.) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión; se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, pH y composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión de la droga en ese medio, de la temperatura y atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria.

Para que los resultados sean confiables los procedimientos deberán ser controlados cuidadosamente y las tablas de interpretación tendrán validez únicamente cuando la metodología utilizada en el laboratorio sea estrictamente comparable con la aplicada en la elaboración de dichas tablas.

Las pruebas de sensibilidad se deben realizar a partir de colonias aisladas. Se debe evitar la realización del antibiograma en forma directa, a partir del material clínico, excepto en las emergencias clínicas donde la coloración directa de Gram sugiera que el cultivo es monobacteriano. En este caso, debe luego repetirse la prueba, usando la metodología estandarizada.

## FUNDAMENTOS PARA LA INTERPRETACION DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS POR EL METODO DE DIFUSION

Para cada antimicrobiano se establecen "concentraciones críticas" o "puntos de corte" que permiten separar a los microorganismos infectantes en tres categorías, sensibles, resistentes o de sensibilidad intermedia, según si la concentración requerida para la inhibición del desarrollo de cada uno de ellos (CIM) es inferior o no a dichas concentraciones.

\***Sensible:** Un microorganismo se considera "sensible" a un antibiótico cuando se puede esperar que una infección causada por el mismo responda al tratamiento con dicho fármaco a la dosis recomendada.

\***Resistente:** este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al antibiótico en cuestión, cualesquiera que sean la dosis y la localización de la infección.

\*La categoría **sensibilidad intermedia** se aplica a dos situaciones. Por un lado, se incluyen en ella las cepas con sensibilidad disminuida a un antibiótico que puede utilizarse con éxito, para el tratamiento en dosis más altas, por ser poco tóxico o porque se concentra en el foco de infección (por ejemplo, antibióticos  $\beta$ -lactámicos o quinolonas en la orina).

En esta categoría se incluyen asimismo las cepas de "sensibilidad intermedia" a antibióticos que, por ser más tóxicos, no puede usarse en dosis más altas. En este caso, la categoría intermedia sirve como una zona de transición entre las cepas sensibles y las resistentes y previene pequeños factores técnicos que pueden llevar a resultados de sensibilidad erróneos. Muchas veces un resultado intermedio requiere la definición de la sensibilidad mediante el uso de un método cuantitativo como la CIM.

La decisión definitiva sobre el uso de un determinado antibiótico y sobre la dosificación del mismo no sólo depende de los resultados de las pruebas de sensibilidad sino también de la interpretación de éstas por el equipo de salud. También habrá que tener en cuenta otros factores como la importancia patogénica del microorganismo, los efectos secundarios y las propiedades farmacocinéticas del medicamento, su difusión en las diferentes regiones del cuerpo y el estado inmunitario del huésped.

### **¿Frente a qué microorganismos corresponde realizar estudios de sensibilidad a los antimicrobianos?**

Las pruebas de sensibilidad están indicadas para cualquier microorganismo cuya sensibilidad no pueda ser predicha a partir del conocimiento de la identidad del germen o si se requieren drogas alternativas a las de eficacia demostrada, como es el caso de los pacientes alérgicos a la penicilina con infecciones por *Streptococcus pyogenes*.

Nunca se deben hacer pruebas de sensibilidad sobre gérmenes contaminantes o comensales pertenecientes a la flora normal, ni con otros microorganismos sin relación causal con el proceso infeccioso.

Las tablas de interpretación disponibles se puede aplicar sólo a los resultados obtenidos con microorganismos de rápido crecimiento. Esto se debe a que el tamaño de la zona de inhibición es la resultante, entre otros factores, de la relación entre la velocidad de duplicación bacteriana y la de difusión de la droga en el medio de cultivo.

### **Drogas a ensayar**

La selección de los agentes antimicrobianos apropiados para las pruebas de sensibilidad, es una decisión de cada laboratorio clínico en consulta con el cuerpo médico, el comité de farmacia y el comité de enfermedades infecciosas.

Para evitar errores en la interpretación, el informe de rutina al médico deberá incluir únicamente las drogas apropiadas para el tratamiento adecuado del microorganismo estudiado. Los resultados obtenidos con otras drogas, que pueden ser probadas para proveer datos taxonómicos o información epidemiológica deberán estar disponibles sólo para el laboratorio o para el comité de control de infecciones.

Para la realización de una adecuada prueba de sensibilidad, el número de agentes probados debe ser limitado. En general, se deberá incluir sólo un representante de cada grupo de drogas relacionadas con actividad casi idéntica y para las cuales la interpretación podría ser la misma.

### **Medio de cultivo**

De los medios disponibles, el agar Mueller Hinton es considerado como el mejor para las pruebas de sensibilidad de rutina de microorganismos de rápido crecimiento sin exigencias nutricionales especiales debido a que:

- Muestra buena reproducibilidad entre los distintos lotes.
- Tiene bajo contenido de inhibidores para sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclinas
- Es adecuado para el crecimiento de la mayoría de las bacterias patógenas.
- Existen suficientes datos recopilados que avalan la calidad de los resultados de las pruebas de sensibilidad realizadas con este medio.

Aunque el agar Mueller Hinton es generalmente confiable para las pruebas de sensibilidad, los resultados obtenidos con algunos lotes pueden, en ocasiones, variar significativamente.

Si un lote del medio no sustenta adecuadamente el crecimiento de los microorganismos en estudio, los halos obtenidos en las pruebas por difusión podrían ser mayores quedando fuera de los límites de control de calidad, conduciendo a resultados erróneos.

## **Volumen**

El agar Mueller Hinton puede prepararse en el laboratorio a partir de una base comercial deshidratada, siguiendo las instrucciones del productor.

Después de retirarse del autoclave debe permitirse su enfriamiento en un baño María a 45-50°C.

Se debe verter en placas de Petri de vidrio o plástico de fondo plano, inmediatamente después de haberse enfriado hasta los 45-50°C .

El volumen del medio de cultivo deberá ser tal que pueda obtenerse una altura de 4 mm; Esto corresponde a 60 - 70 ml de agar para placas de 150 mm de diámetro interno y de 25 a 30 ml para las de 100 mm de diámetro interno. Se demostró que con volúmenes mayores o menores de agar, la prueba pierde reproducibilidad ya que pequeñas variaciones tienen efectos significativos.

Las placas que no se usan en el día pueden mantenerse en refrigerador (2 - 8°C.).

Las placas con más de 7 días de preparación no son adecuadas para las pruebas, salvo que sean refrigeradas envueltas en bolsas de plástico para evitar la desecación, de lo contrario deberán controlarse con los microorganismos de referencia. Las placas almacenadas en bolsas de plástico tienen un período de uso de hasta 70 días.

Una muestra representativa de cada lote, debe ser examinada para esterilidad, incubándosele a 30 - 35 °C por un período de 24 horas o más. No debe haber crecimiento de colonias bacterianas o micóticas.

## **pH**

El pH debe ser controlado cuando se prepara cada lote de medio de cultivo. El método a utilizar dependerá del tipo de equipo disponible en cada laboratorio. El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente y debe determinarse después de su esterilización. Las correcciones necesarias serán realizadas por el agregado de NaOH 1M o HCl 1M. Recordar que un pH muy ácido hace que drogas como los aminoglucósidos y macrólidos pierdan potencia mientras que un pH muy alcalino disminuye la actividad de las penicilinas. Es ideal el uso de electrodos de superficie, pero también resulta satisfactorio la determinación del pH del macerado de una alícuota solidificada de agar, suficiente para que el bulbo del electrodo quede totalmente sumergido. Si el pH está muy alejado del rango aceptable debe controlarse el procedimiento de la preparación del medio. Debe asegurarse que el electrodo de superficie esté adecuadamente calibrado.

En la tabla 1 se muestran los efectos de las variaciones de pH sobre las distintas familias de antimicrobianos.

**Tabla1: Variación de la actividad de diferentes antimicrobianos con el cambio del pH**

AUMENTO DE LA ACTIVIDAD	
pH ácido	pH alcalino
Amoxicilina	Amicacina
Amplicilina	Netilmicina
Carbenicilina	Estreptomina
Cloxacilina	Tobramicina
Piperacilina	Claritromicina
Tetraciclina	Eritromicina
Doxiciclina	Ac. Nalidixico
Minociclina	Quinolonas Fluoradas
Nitrofurantoina	
DISMINUCION DE LA ACTIVIDAD	
pH ácido	
Azitromicina	
Claritromicina	
Clindamicina	
Metronidazol	
PEQUEÑOS CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD CON EL AUMENTO O DISMINUCION DEL pH	
Penicilina	
Cefalotina	
Cefalexina	
Cefoperazona	
Ceftazidima	
Ceftriaxona	
Cloranfenicol	
Polimixina B	
Sulfonamidas	
Trimetoprima	

### Humedad

Si se observa un exceso de humedad en la superficie, las placas deben ser incubadas a 35°C durante 10 - 30 min . Las placas deberán estar húmedas pero no mostrar gotas sobre la superficie del medio o sobre la cubierta de la placa de Petri al momento de ser incubadas.

### Suplementos

El agregado de sangre u otros suplementos están indicados exclusivamente para las pruebas con cepas que no crecen satisfactoriamente en Mueller Hinton no suplementado (ej. *Streptococcus pneumoniae* y otros *Streptococcus spp*); en este caso se adiciona sangre de oveja defibrinada al medio fundido y enfriado, en una concentración final de entre 3 y 5 % (V/V).

Cuando se utiliza agar Mueller Hinton suplementado con sangre, las zonas de inhibición obtenidas con algunas drogas como oxacilina pueden resultar levemente menores (2-3 mm) con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

El agregado de sangre de carnero puede provocar el desarrollo de una fina película de crecimiento del microorganismo dentro de la zona de inhibición de sulfonamidas y trimetoprima, debido a la incorporación de inhibidores de estas drogas.

No deben realizarse antibiogramas con agar chocolate para la determinación de la sensibilidad de *Haemophilus* spp o *Neisseria gonorrhoeae* porque no hay tablas de interpretación con este medio de cultivo, que por su opacidad y composición poco definida ha sido reemplazado por medios de cultivos específicos, según se describirá mas adelante.

### **Conservación de los discos:**

Los discos deben mantenerse refrigerados a 2 - 8°C (si van a ser utilizados en los siguientes 7 días) o en congelador (freezer) a -14 °C o menos (para conservación a largo plazo). Para mantener su potencia, los discos que contienen drogas de la familia de los β-lactámicos deben mantenerse en congelador (freezer), salvo una pequeña provisión que pueden permanecer en el refrigerador.

Los discos deben guardarse en contenedores herméticos con desecante y ser sacados del refrigerador o congelador (freezer) 1 ó 2 horas antes de su uso a fin de lograr un equilibrio en la temperatura antes de ser abiertos los frascos o contenedores. Este proceso evita la condensación que podría ocurrir cuando la humedad ambiente alcanza los frascos fríos. La mayoría de las drogas antibacterianas son más sensibles a la exposición a un ambiente húmedo que a temperaturas templadas. Los antimicrobianos más afectados por los problemas de conservación son, en general, los β-lactámicos y dentro de esta familia, los carbapenemes (meropenem e imipenem), oxacilina, cefaclor, las combinaciones de β-lactámicos con inhibidores de β-lactamasas (amoxicilina/ac. clavulánico, ampicilina/sulbactam, ticarcilina/ac. clavulánico, cefoperazona/sulbactam y piperacilina/tazobactam) son los más lábiles.

Cuando el indicador del desecador usado (por ej. gel de sílice) cambia de color debe interpretarse como un exceso de humedad y reemplazarse.

### **Inóculo**

#### **Patrón de turbidez:**

Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland). El estándar de Mc Farland de 0.5 tiene una turbidez comparable a una suspensión bacteriana que contiene  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL.

Preparar dicho estándar agregando 0,5 ml de BaCl<sub>2</sub> 0,048M (1,175% P/V BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) a 99,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,18 M (0,36 N) (1% V/V). Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debería ser 0,08 a 0,10, para el estándar 0,5 de Mc Farland.

Distribuir en 4-6 ml dentro de tubos similares a los usados para la preparación de los inóculos y mantener guardados a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Los tubos se deben sellar estrechamente al ser preparados, para evitar la evaporación de la suspensión.

Agitar vigorosamente con vortex o manualmente el estándar antes de su uso para lograr una turbidez homogénea.

Reemplazar o verificar la confiabilidad de los estándares mensualmente. Descartar los estándares, que presenten alguna evidencia de evaporación. Esto puede controlarse marcando los tubos en el momento de la preparación con una marca a la altura del menisco. Si la evaporación es evidente, descartar los tubos. En la tabla 2 se presenta una guía para la preparación de los distintos estándares de la escala de McFarland.

**Tabla 2: Preparación de los estándares de McFarland**

Estándar Nº	Volumen (ml)		Equivalente en N° de bacterias/ml (x10 <sup>8</sup> )
	BaCl <sub>2</sub> (1,175 %)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1 %)	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

**Preparación del inóculo:**

A partir de 4 ó 5 colonias bien aisladas y de igual morfología en un medio de aislamiento primario como por ejemplo, agar de Mc Conkey o agar sangre de carnero, preparar una suspensión en 4 ó 5 ml de un caldo apropiado (tripteina soja (soya) u otro) tocando la parte superior de cada colonia. Sumergir el hisopo y enjuagar bien en el medio líquido para descargar todo el material. Incubar el tubo de cultivo en baño María a 35-37 °C hasta que se alcance o exceda la turbidez del estándar (2 - 4 h).

Diluya el inóculo con solución salina o caldo hasta alcanzar una turbidez comparable al 0,5 de Mc Farland, por comparación visual con el estándar. Agitar vigorosamente con vortex o manualmente tanto el tubo con el inóculo como el estándar de Mc Farland. Posteriormente mirar los tubos contra un fondo blanco con una o varias líneas negras como contraste. Recordar: La suspensión estandarizada del inóculo debe de ser utilizada en los siguientes 15 minutos de su preparación.

**Para microorganismos de difícil desarrollo:**

El inóculo puede ser realizado directamente a partir de colonias seleccionadas de una placa de cultivo no selectivo, de no más de 18 a 24 horas de incubación. La suspensión debe ser ajustada inmediatamente a la escala 0,5 de Mc Farland, sin incubación previa.

Este es el método de elección para microorganismos de difícil desarrollo como *Haemophilus* spp, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria gonorrhoeae* o para *Staphylococcus* potencialmente meticilino resistentes. Cuando se prueban discos de trimetoprima-sulfametoxazol con este método, pueden arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición.

**Inoculación de las placas**

Dentro de los 15 minutos posteriores a haberse ajustado el inóculo, sembrar las placas de Mueller Hinton con un hisopo estéril. Presione el hisopo rotándolo firmemente contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de inóculo.

Inocular la superficie seca del agar por hisopado en dos o tres direcciones para asegurar una completa y homogénea distribución del inóculo. Las zonas de inhibición deberán ser uniformemente circulares y el desarrollo bacteriano confluyente o casi confluyente.

Nunca usar otros inóculos no estandarizados para el hisopado de las placas. Los excesos o defectos en la densidad del inóculo producen cambios muy drásticos en los resultados finales del ensayo.

## Aplicación de los discos de antibióticos en las placas inoculadas

Esperar de 3 a 5 minutos, pero no más de 15 min antes de aplicar los discos para que el exceso de humedad superficial sea absorbido.

Colocar los discos sobre la superficie del agar inoculado, con pinza de punta fina estéril y aplicando una ligera presión, a una distancia no menor a 24 mm desde un centro al otro. La distancia al borde de la placa al disco no debe ser menor de 14 mm. En algunos laboratorios se cuenta con dispensadores automáticos. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar. **No deben colocarse más de 12 discos por placa de 150 mm y no más de 6 a 7 discos por placa de 100 mm.**

## Incubación

Incubar las placas invertidas a 35 °C dentro de los 15 minutos posteriores a que los discos fueron aplicados y sin concentración incrementada de CO<sub>2</sub> con excepción de *Haemophilus* spp, *Neisseria gonorrhoeae* y *S. pneumoniae*. Los estándares de interpretación fueron desarrollados usando incubación ambiente y el agregado de CO<sub>2</sub> altera significativamente el tamaño de las zonas de inhibición de algunos agentes antimicrobianos.

El tiempo de incubación es de 16 a 18 h, a menos que se trate de una cepa de *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus* spp, que deben incubarse por 24 horas completas para optimizar la detección de resistencia a oxacilina y vancomicina, respectivamente.

## Lectura de las placas

Usar luz transmitida para examinar las zonas de inhibición de penicilinas resistentes a penicilinas y vancomicina en el caso de *Staphylococcus* y *Enterococcus*. Examinar si existe un ligero crecimiento dentro de las zonas de inhibición de oxacilina o vancomicina. Cualquier desarrollo dentro de estas zonas de inhibición es indicativo de metilino o vancomicino resistencia.

Para el resto de los antimicrobianos, el punto final deberá tener en cuenta el área que no muestre desarrollo obvio a simple vista, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas sólo con mucha dificultad en el borde de la zona. Colonias mayores, creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. En medios suplementados con sangre, deberá medirse la zona de inhibición del crecimiento y no la zona de hemólisis. Se sugiere efectuar dicha lectura con calibre (vernier, nonio, pie de rey), regla graduada en milímetros o plantillas especiales sobre un fondo negro u oscuro y utilizando luz reflejada. Todas las mediciones se efectúan con aproximación de 1 mm y la persona que las interpreta debe de tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo. La lectura se efectúa por la parte posterior de la placa (base del agar). En el caso de medios que contienen sangre, la lectura se efectúa por la parte superior habiéndose removido la cubierta de la placa (superficie del agar).

Los tamaños de las zonas de inhibición serán interpretados con las tablas correspondientes y los organismos se informarán como sensibles, intermedios o resistentes frente al antimicrobiano ensayado.

## CONTROL DE CALIDAD

### Propósito

El objetivo de un programa de control de calidad es el monitoreo de:

- La exactitud y precisión de los procedimientos para realizar las pruebas de sensibilidad.
- La calidad de los reactivos usados en las pruebas.
- El desempeño de las personas que llevan a cabo los ensayos y la lectura de los resultados.

Estos objetivos son alcanzados principalmente por la utilización de cepas de referencia seleccionadas por su estabilidad genética y por su utilidad en los métodos a ser controlados.

### CEPAS CONTROL

Para controlar la precisión y la exactitud de las pruebas de difusión, se deben obtener de una fuente confiable las siguientes cepas patrones para control de calidad:

- *E. coli* ATCC® 25922
- *P. aeruginosa* ATCC® 27853
- *S. aureus* ATCC® 25923
- *E. faecalis* ATCC® 29212
- *E. coli* ATCC® 35218
- *N. gonorrhoeae* ATCC® 49226
- *H. influenzae* ATCC® 49247
- *H. influenzae* ATCC® 49766
- *H. influenzae* ATCC® 10211
- *S. pneumoniae* ATCC® 49619
- *K. pneumoniae* ATCC® 700603

La *E. coli* ATCC® 35218 productora de  $\beta$ -lactamasa se recomienda solamente para el control de calidad de los discos que contengan la combinación " $\beta$ -lactámico/Inhibidor de  $\beta$ -lactamasa", entre estos inhibidores se encuentran: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.

Cuando se prueben rutinariamente sulfonamidas, trimetoprima ó trimetoprima-sulfametoxazol, debe controlarse, para cada lote nuevo de Mueller Hinton, los niveles de timina ó timidina. Para ello debe utilizarse *E. faecalis* ATCC® 29212 ó 33186.

Para controlar los discos de alta carga de aminoglucósidos utilice *E. faecalis* ATCC® 29212 y *E. faecalis* ATCC® 51299 .

Las siguientes tablas muestran algunas de las cepas utilizadas más comúnmente en el control de calidad, los factores a evaluar y algunas de sus características.

**TABLA 3**

**CONTROL DE CALIDAD INTERNO**

**Microorganismos sugeridos para el control de calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos**

<b>Cepa</b>	<b>- Factores a evaluar: Propiedades</b>
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración de cationes: Aumento de resistencia a aminoglucósidos cuando aumenta la concentración de calcio y magnesio.</li> <li>- pH: Aumento de resistencia a aminoglucósidos cuando el pH del medio disminuye.</li> <li>• No subcultivar, se seleccionan mutantes resistentes a las penicilinas activas frente a <i>Pseudomonas</i> spp</li> <li>• Frente a un doble halo alrededor del disco de imipenem, cambiar el lote de MuellerHinton.</li> </ul>
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>	- Calidad de la prueba de sensibilidad
<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 35218</b>	- Concentración de inhibidores de $\beta$ -lactamasas. Probar solo frente a combinaciones como ampicilina/sulbactama, amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ ácido clavulanico, etc.
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	- Calidad de la prueba de sensibilidad
<b><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentración de timidina: Este compuesto interfiere con la actividad de trimetoprima y de sulfametoxazol.</li> <li>- Control negativo de la detección de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos</li> </ul>

**Estos microorganismos deberán utilizarse una vez por semana para el control general de procedimientos.**

**TABLA 4:  
OTROS CONTROLES DE CALIDAD INTERNO**

<b>Cepa</b>	<b>Propiedades</b>
<b><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cepa resistente a vancomicina y a altos niveles de aminoglucósidos.</li> <li>• Control positivo para la detección de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos</li> <li>• Control positivo para la prueba de “screening” en agar para la detección de resistencia a vancomicina</li> </ul>
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cepa meticilino-resistente, con CIM de oxacilina: 8 mg/L</li> <li>• Control positivo para la prueba de “screening” en agar de meticilino resistencia (6 mg/l de oxacilina en MH)</li> </ul>
<b><i>Enterococcus faecalis</i> M 2110</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cepa productora de <math>\beta</math>-lactamasa (cepa de colección INEI-Malbrán)</li> <li>• Control positivo para la detección de <math>\beta</math>-lactamasas en enterococos.</li> </ul>
<b><i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cepa resistente a ampicilina no productora de <math>\beta</math>-lactamasas.</li> <li>• Control de calidad de la prueba de difusión para <i>Haemophilus</i> utilizando HTM (utilizada para todas las drogas excepto cefalosporinas).</li> </ul>
<b><i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indicada para control de calidad de los discos de cefalosporinas.</li> </ul>
<b><i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cepa nutricionalmente exigente. Indicada para el control de calidad del medio de cultivo HTM (Haemophilus Test Media).</li> </ul>
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cepa con sensibilidad intermedia a penicilina. Indicada para control de calidad de la prueba de sensibilidad.</li> </ul>

**El control de calidad con estas cepas deberá realizarse periódicamente cuando se estudien los microorganismos correspondientes.**

Las cepas patrones para el control de calidad se deben probar y mantener de la siguiente manera:

- Las cepas de control de calidad se deben probar por la técnica estandarizada de difusión en agar descrita anteriormente. Los antibióticos a ensayar deben ser los mismos que se utilizan para los aislamientos clínicos.
- Las cepas de control de calidad de trabajo se deben conservar a 4 - 8°C en agar tripticasa de soja (soya) (no exigentes o fastidiosas) o estrías de agar chocolate enriquecidas (exigentes o fastidiosas) y se deben subcultivar semanalmente. Si las quiere almacenar por tiempo prolongado, puede hacerlo de la siguiente manera: Mantenga los cultivos a -20 °C ó menos (pej.: Nitrógeno líquido) en medios adecuados (pej.: 10-15 % de glicerol en caldo Trypticase - Soja (Soya), caldo al 50 % de Suero fetal bovino, en sangre de oveja defibrinada ó en leche descremada) o en estado liofilizado minimizando de esta manera el riesgo de alterar su sensibilidad a los antibióticos.
- Los cultivos de trabajo deben ser reemplazados por lo menos una vez al mes a partir de cultivos congelados, liofilizados o comerciales.
- Antes de su utilización las cepas patrón se deben sembrar sobre una placa de agar con el fin de obtener colonias aisladas.

- Los inóculos para realizar los ensayos de sensibilidad con las cepas de referencia se deben preparar siguiendo las mismas indicaciones que se utilizan para los aislamientos clínicos ya sea permitiendo que el cultivo alcance fase logarítmica o bien resuspender colonias provenientes de una placa de 18-24 h de incubación.
- Las cepas de control de calidad pueden ser utilizadas para ensayar la precisión y la exactitud de las pruebas de sensibilidad hasta tanto no presenten un cambio significativo en los diámetros de las zonas de inhibición que no puedan ser atribuidos a fallas metodológicas. Si aparecen resultados inexplicables que sugieran un cambio en la sensibilidad propia del microorganismo, se debe obtener un nuevo cultivo a partir de las cepas almacenadas.

## **CONTROL DE MEDIOS DE RUTINA Y REACTIVOS USADOS EN LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS**

### **Parámetros que se evalúan cuando se utilizan cepas de referencia para el control de calidad**

- A) Potencia de los antimicrobianos
- B) Medios de cultivo
  1. pH
  2. Cationes  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$
  3. Contenido de timidina
  4. Factores de crecimiento, composición del medio
  5. Profundidad del agar para la prueba de difusión por discos
- C) Condiciones de incubación (temperatura y atmósfera)
- D) Inóculo y técnica de inoculación.
- E) Contaminación de los medios de cultivo.
- F) Funcionamiento del instrumental.
- G) Medida del punto final

### **Parámetros que no se evalúan eficientemente mediante el uso de cepas de referencia para control de calidad.**

- A) Problemas concernientes al antimicrobiano en las pruebas de sensibilidad (pej. discos, pocillos o tubos: vacíos, secos, sobre o subcargados).
- B) Contaminación esporádica de los medios de cultivo.
- C) Mal funcionamiento momentáneo del instrumental.
- D) Presencia de NaCl en los caldos para la prueba de oxacilina para *Staphylococcus* spp
- E) Lectura subjetiva de puntos finales poco definidos (pej. halos de inhibición difusos).
- F) Interpretación de resultados, uso de criterios apropiados de interpretación.

- G) Errores de transcripción.
- H) Errores técnicos individuales.
- I) Aislamientos clínicos que son considerablemente diferentes a las cepas de control de calidad recomendadas (de manera que sólo son controladas modestamente con las pruebas de las cepas de referencia sugeridas por la NCCLS), algunos de los cuales incluyen:
- 1) Otros *Streptococcus* spp distintos de *S. pneumoniae*.
  - 2) *Corynebacterium* spp
  - 3) Otros organismos fastidiosos (exigentes)
  - 4) Organismos con características de crecimiento inusuales (pej. *P. aeruginosa* mucosa, o *E. coli* de difícil crecimiento)

Son numerosos los factores que pueden dar como resultado una alteración en el tamaño final de las zonas de inhibición. Las causas probables de algunas de ellas se indican en la tabla siguiente.

**TABLA 5:** Probables causas para la obtención de resultados no concordantes con los valores esperados, en las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos por método de difusión, al utilizar cepas de referencia.

Efecto observado con las cepas de referencia	Causas probables
Agrandamiento general de las zonas	Bajo inóculo Volumen insuficiente del medio de cultivo Sobrecarga de los discos
Disminución general de las zonas	Alto inóculo Volumen excesivo del medio de cultivo Inactivación de la droga de los discos Discos vencidos
Trimetoprima-Sulfametoxazol, disminución del tamaño de la zona y/o aparición de colonias internas	Exceso de timidina en el medio de cultivo. Se corrige con el agregado (5% V/V) de sangre lisada de caballo, rica en timidina fosforilasa. <sup>a</sup>
Tetraciclinas, quinolonas fluoradas, colistina o aminoglucósidos	
- Disminución de las zonas, especialmente frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- Exceso del contenido de cationes divalentes: Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup>
- Aumento de las zonas	- Escaso contenido de cationes divalentes
Aminoglucósidos, macrólidos	
- Disminución de las zonas	pH menor a 7,2
Penicilinas	
- Aumento de las zonas	pH menor a 7,2

a) El agregado de timidina fosforilasa o sangre lisada de caballo puede mejorar la nitidez de los halos y la confiabilidad de las pruebas para sulfonamidas y trimetoprima frente a patógenos comunes, excepto para enterococos. Para evaluar cada lote de Mueller Hinton en su contenido de timidina se debe utilizar una cepa control (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o ATCC 33186) que se prueba frente a discos de trimetoprima / sulfametoxazol. Un medio satisfactorio mostrará un halo de inhibición claro y definido de 20 mm o más.

### **Identificación bacteriana:**

La interpretación de las pruebas de sensibilidad no puede estar dissociada de la identificación bacteriana. Por ejemplo, una CIM de penicilina mayor a 1ug/ml es indicativa de resistencia si el microorganismo en estudio es un neumococo, mientras que un enterococo, con CIMs hasta 16 veces superior, es considerado sensible a la misma droga.

Por el contrario, la resistencia intrínseca puede ser extremadamente útil para corregir o confirmar la identificación bacteriana. Por esta razón, frecuentemente se ensayan *in vitro* ciertos antimicrobianos que no son terapéuticamente útiles pero contribuyen con el control de calidad de la identificación bacteriana. Los resultados obtenidos con estos antibióticos nunca deben ser informados al médico.

### **Límites de los diámetros de la zona de inhibición**

Los diámetros de la zona de inhibición máximos y mínimos aceptables para una prueba de control de calidad están enumerados en las tablas 3, 3A, 3B y 3C de las normas del NCCLS ( Performance Standards for Antimicrobials Disk Susceptibility Tests-Sixth Edition; Approved Standard. January 1997). En general se acepta que en una serie de pruebas uno de cada veinte ensayos consecutivos de control de calidad esté fuera de los rangos establecidos. Si aparece más de un resultado fuera de dichos rangos, se deben tomar medidas correctivas.

### **Frecuencia de las pruebas**

Cada vez que se introduce un nuevo lote de discos de antimicrobianos a la rutina, este se debe ensayar con las cepas patrón de control de calidad apropiadas.

Las cepas patrón de control de calidad se deben probar semanalmente y cada vez que se cambie cualquier reactivo que intervenga en la realización de las pruebas de sensibilidad; los discos de antibiótico a ensayar deben ser los mismos que se utilizan de rutina para los aislamientos clínicos. Cuando un ensayo dé como resultado halos de inhibición que estén fuera del rango aceptable, se deben tomar medidas correctivas. Si la desviación se puede atribuir a un error obvio, como por ejemplo discos o cepas de control anómalos, contaminación de la cepa control o atmósfera de incubación incorrecta, se debe repetir la prueba de control de calidad.

Si dicha desviación no se puede atribuir a un error obvio, se debe continuar con los controles de calidad diariamente hasta detectar la fuente de error y documentar la solución del problema.

### **Fuentes comunes de error en el método de difusión por discos**

Deberán considerarse las siguientes fuentes de error cada vez que un diámetro de inhibición se encuentre fuera de los límites aceptables según las Tablas 3 y 3A (M100 S10) de las normas del NCCLS (Performance Standards for Antimicrobials Disk Susceptibility Tests-Seventh Edition; Approved Standard. January 2000):

- Errores de transcripción de los resultados de las pruebas de control de calidad
- Error del operador en la medición de los diámetros
- Contaminación u otros cambios en la cepa control
- inóculos demasiado densos (concentrados) o demasiado livianos (diluidos)
- Deterioro del patrón de turbidez 0,5 de Mc Farland o deficiente agitación del mismo
- Temperatura y/ o atmósfera de incubación incorrecta
- Variabilidad en la calidad y la preparación del medio, cada nuevo lote debe ser controlado antes de su utilización
- Discos con carga excesiva o pérdida de potencia de los mismos durante el manipuleo o almacenamiento en el laboratorio

Algunas de estas fuentes de error pueden ser rápidamente solucionadas mediante un cuidadoso examen de los resultados de los ensayos de control de calidad. De no ser así, debe continuarse con los controles de calidad diarios, hasta tanto se detecte la causa del desvío.

## LIMITACIONES DEL METODO DE DIFUSION POR DISCOS

### Grupos de microorganismos donde se puede aplicar la prueba de difusión por discos

El método de difusión descrito en este documento ha sido estandarizado para patógenos de rápido desarrollo, entre los cuales se incluyen *Staphylococcus* spp, *Enterococcus* spp, Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp ; y ha sido modificado para probar algunos organismos fastidiosos (exigentes) como *Haemophilus* spp, *N. gonorrhoeae* y *Streptococcus* spp

La aplicación de este método para el estudio de la sensibilidad de otros microorganismos no enumerados en este documento no garantiza la confiabilidad de los resultados obtenidos. Estos microorganismos podrían requerir un medio diferente, diferentes atmósferas de incubación, o mostrar una marcada diferencia en el grado de crecimiento entre cepas de una misma especie. Tales organismos no se deben probar por el método de difusión por discos, dado que los resultados pueden conducir a interpretaciones erróneas.

### Resultados incorrectos

Se pueden obtener resultados incorrectos cuando se ensayan determinados agentes antimicrobianos con ciertos microorganismos. Algunos ejemplos de estas combinaciones incluyen: cefalosporinas de 1era. y 2da. generación y aminoglucósidos con *Salmonella* spp y *Shigella* spp; todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (excepto oxacilina, metilicina y nafcilina) con *Staphylococcus* metilino resistentes; cefalosporinas, aminoglucósidos (con excepción de los discos de alta carga), clindamicina y trimetoprima/sulfametoxazol con *Enterococcus* spp; y cefalosporinas con *Listeria* spp.

### Emergencia de resistencia

Algunos agentes antimicrobianos están asociados con la emergencia de resistencia durante terapias prolongadas. Mas aún, aislamientos inicialmente sensibles podrían transformarse en resistentes dentro de los tres a cuatro días de haberse iniciado la terapia antimicrobiana. Esto ocurre con mayor frecuencia en *Enterobacter* spp. , *Citrobacter* spp y *Serratia* spp con cefalosporinas de 3era. generación; en *P. aeruginosa* con todos los antibióticos y en *Staphylococcus* spp con quinolonas.

### Medidas para asegurar un correcto control de calidad

La obtención de resultados aceptables con las cepas de control de calidad no garantiza que los resultados obtenidos con los aislamientos clínicos sean correctos. **Cuando se obtienen resultados de sensibilidad atípicos en un aislamiento clínico se debe repetir la prueba y/o confirmar la tipificación del mismo.** En las tablas 5, 6 y 7 se presentan las resistencias naturales de las enterobacterias, los bacilos gram negativos no fermentadores y los cocos positivos más comunes en la clínica diaria. Estas resistencias muchas veces puede ayudar al bacteriólogo a confirmar o no la identificación bacteriana. Cabe destacar que todos estos microorganismos pueden tener además resistencias adquiridas a varios de los antimicrobianos para los cuales las cepas salvajes son sensibles.

Por otra parte se debe tener en cuenta que la resistencia a algunos antibióticos en determinados microorganismos es sumamente inusual y debe, por lo tanto, confirmarse. Si dicha resistencia se repite, el aislamiento debe derivarse a un centro de referencia para su confirmación y caracterización del mecanismo involucrado. Algunos ejemplos de estas combinaciones microorganismo-droga incluyen resistencia a:

- cefotaxima, quinolonas fluoradas o azitromicina en *Haemophilus influenzae*
- carbapenemes en cualquier enterobacteria.
- vancomicina en *Staphylococcus* spp o *Streptococcus* spp.
- cefalosporinas de tercera generación en *Shigella* spp.
- quinolonas fluoradas en *Shigella* spp. o *Salmonella* spp.
- penicilina en *Streptococcus piogenes*

La detección temprana de este tipo de cepas permitirá dar la voz de alarma y de esa manera elaborar estrategias para evitar su diseminación.

Cada laboratorio debería desarrollar sus propias reglas para detectar las posibles fallas en las pruebas de sensibilidad y proceder así a su corrección.

## CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO SOLIDOS Y LIQUIDOS

### A- Control de esterilidad

- 1- Para verificar la esterilidad del medio, tome una muestra equivalente al 5-10% del total del lote producido, incube en estufa de 35°C durante 48 h.
- 2- Ignorar cualquier contaminación esporádica ; ej. una fracción de medio.
- 3- Descartar el lote completo, si el nivel de contaminación es significativo (>10% del medio controlado).
- 4- Descartar todo el medio utilizado para los controles.

### B- Control de pH

- 1- Controlar el pH de cada nuevo lote de medio preparado tan pronto como se haya enfriado a temperatura ambiente.
- 2- Para controlar el pH de los medios sólidos utilice uno de los siguientes métodos
  - (a) Utilizar un electrodo de superficie.
  - (b) Macerar el medio en agua destilada y utilizar un electrodo de inmersión.
  - (c) Permitir que el agar solidifique alrededor del electrodo del pH metro.
- 3- Para controlar los caldos sumerja el electrodo de inmersión en el líquido según las instrucciones del pH metro.
- 4- Los rangos de pH aceptados para Mueller Hinton y agar base GC son 7.2-7.4.

### C- Control de la profundidad del agar

- 1- Controle la profundidad de entre 2 a 5 placas del total del lote preparado
- 2- Para medir la profundidad introduzca un elemento fino, estéril, marcado en 3 y 5 mm de uno de sus extremos dentro del agar.
- 3 - El rango de profundidad aceptado para la prueba de difusión es de 3 a 5 mm.

### D- Contenido de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>

- 1- Para determinar la concentración de estos cationes en caldo enviar una alícuota al laboratorio de química para que éste analice el contenido de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>.
- 2- Para controlar el contenido de cationes de los medios sólidos y líquidos realice la prueba de sensibilidad correspondiente (antibiograma por difusión o CIM) enfrentando los aminoglucósidos con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- 3- Los rangos aceptados son los siguientes (Método de absorción atómica o equivalente):  
Ca<sup>++</sup> = 20 -25 mg/L; Mg<sup>++</sup> = 10 -12.5 mg/L.

### **E- Contenido de timidina**

Para controlar el contenido de timidina de los medios sólidos o líquidos realice la prueba de sensibilidad correspondiente (antibiograma por difusión o CIM) enfrentando trimetoprima-sulfametoxazol con *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Rangos aceptables:

Difusión por discos:  $\geq 20$  mm

Concentración inhibitoria mínima:  $\leq 0.5/9.5$  µg/ml

### **F- Capacidad de los medios de cultivo de permitir el crecimiento bacteriano**

Antes de utilizar un medio de cultivo para pruebas de sensibilidad de aislamientos clínicos, se debe controlar que el mismo: permita el crecimiento de las bacterias a evaluar, no presente incompatibilidad con ningún antibiótico, y muestre resultados aceptables en pruebas de sensibilidad. Estos controles se deben realizar con cepas de referencia.

### **G- Apariencia de los medios de cultivo**

Antes de su utilización, se debe controlar que los medios de cultivo no presenten evidencia de:

- Decoloración
- Deshidratación
- Rotura del agar
- Volumen insuficiente
- Otros signos de deterioro

Descartar los medios que presenten alguna de estas características.

**TABLA 6:** Resistencias naturales en el género enterobacterias

Organismo	AMP	AMP/SUL	CAR TIC	MEZ PIP	CPG	FOX	CTG	CFP	IMP	GEN TOB NET	AKN	CHL	TET	SXT	CIP	NAL	NTI	POL
<i>Aeromonas hydrophila</i> <sup>b</sup>	R <sup>c</sup>	R	R <sup>c</sup>	S-R	R	S-R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter diversus</i>	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	S-R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter freundii</i>	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter aerogenes</i> y <i>E. cloacae</i>	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter Agglomerans</i>	S-R	S-R	S	S	S-R	S-R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>E. coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella</i> spp.	R <sup>c</sup>	S-R	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Morganella morganii</i>	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>
<i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R <sup>c</sup>	S	S	S	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>
<i>Proteus vulgaris</i> y <i>P. penneri</i>	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	R <sup>c</sup>	S	S	S	S	S	S	S	R <sup>c</sup>	S	S	S	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>
<i>Providencia</i> spp.	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	S	S	S	S	R <sup>c</sup>	S	S	R	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>
<i>Salmonella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Serratia</i> spp.	R <sup>c</sup>	R	S	S	R <sup>c</sup>	S-R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>
<i>Shigella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

<sup>a</sup> Abreviaturas: S, sensible; R, resistente; S-R, sensible o resistente; AMP, ampicilina; AMP/SUL, ampicilina/sulbactam; CAR, carbenicilina; TIC, ticarcilina; MEZ, mezlocilina; PIP, piperacilina; CPG, cefalosporinas de primera generación; FOX, cefoxitina; CTG, cefalosporinas de tercera generación; CFP, cefoperazona; IMP, imipenem; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; NET, netilmicina; AKN, amicacina; CHL, cloranfenicol; TET, tetraciclina; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; NAL, ácido nalidixico; NTI, nitrofuratoína; POL, polimixina.

<sup>b</sup> Miembro de la familia *Vibrionaceae*

<sup>c</sup> Muy inusual encontrar aislamientos sensibles a esta droga.

**TABLA 7:** Resistencias naturales en bacilos gram negativos no fermentadores

Organismo	AMP	AMP/SUL	CAR TIC	MEZ PIP	CPG	CSG	CTX	CAZ	CPZ	AZT	IMP	GEN TOB NET	AKN	CHL	TET	SXT	CIP	NAL	NTI	POL
<i>Acinetobacter anitratus</i>	R	S	S	S	R	R	S-R	S	S-R	R	S	S	S	R	S-R	S	S	S-R	R	S
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	R	S	S	S	R	R	S-R	S	S-R	R	S	S	S	S-R	S-R	S	S	S-R	R	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	S	S	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
<i>Burkholderia cepacia</i>	R <sup>b</sup>	R	R	S-R	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	S-R	S	S	S-R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
<i>Pseudomonas fluorescens y P. putida</i>	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	R	S-R	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	R	S	S	S-R	S	S	S	R	S-R	R	S-R	R	R	S
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R	R	S-R	S-R	R <sup>b</sup>	R <sup>b</sup>	R	S-R	S-R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	S-R	S-R	S-R	S-R	R	R	S-R	S	S	S-R	S	S	S	S-R	S	S	S-R	R	R	S

<sup>a</sup> Abreviaturas: S, sensible; R, resistente; S-R, sensible o resistente; AMP, ampicilina; AMP/SUL, ampicilina/sulbactam; CAR, carbenicilina; TIC, ticarcilina; MEZ, mezlocilina; PIP, piperacilina; CPG, cefalosporinas de primera generación; FOX, cefoxitina; CTG, cefalosporinas de tercera generación; CFP, cefoperazona; IMP, imipenem; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; NET, netilmicina; AKN, amikacina; CHL, cloranfenicol; TET, tetraciclina; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; NAL, ácido nalidíxico; NTI, nitrofurantoina; POL, polimixina.

<sup>b</sup> Muy inusual encontrar aislamientos sensibles a esta droga.

**TABLA 8:** Resistencias naturales en cocos gram positivos

Organismo	AMP	AMP/ SUL	PEN	OXA	CPG	CSG	CTG	AZT	IMP	CHL	CLI	ERY	GEN	SXT	VAN
<i>Staphylococcus spp.</i>	R <sup>b</sup>	S	R <sup>b</sup>	S	S	S	S-R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R <sup>d</sup>	(R)	S
<i>Enterococcus faecium</i>	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>	R	R	R	R	R	R <sup>c</sup>	S	R <sup>c</sup>	S	R <sup>d</sup>	(R)	S
<i>Enterococcus raffinosus</i>	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>	R <sup>c</sup>	R	R	R	R	R	R <sup>c</sup>	S	R	S	R <sup>d</sup>	(R)	S
Enterococos móviles <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> y <i>E. flavescens</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R <sup>d</sup>	(R)	(R)
<i>Streptococcus spp.</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R <sup>d</sup>	S	S

<sup>a</sup> Referencias: S, sensible; R, resistente; S-R sensible o resistente; AMP, ampicilina; AMP/SUL, ampicilina/sulbactam; PEN, penicilina; OXA, oxacilina; CPG, cefalosporinas de primera generación; CSG, cefalosporinas de segunda generación; CTG, cefalosporinas de tercera generación; AZT, aztreonam; IMP, imipenem; CHL, cloranfenicol; CLI, clindamicina; ERY, eritromicina; GEN, gentamicina; SXT, trimetoprima/sulfametoxazol; VAN, vancomicina.

<sup>b</sup> Más del 90% de los *Staphylococcus spp.* son productores de β-lactamasas y por lo tanto serán resistentes a AMP y PEN

<sup>c</sup> Es inusual encontrar aislamientos sensibles a esta droga

<sup>d</sup> Resistencia natural de bajo nivel.

## CONTROL DE CALIDAD DEL INSTRUMENTAL EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA

Todo el instrumental utilizado para el procesamiento de muestras en el laboratorio de microbiología debe funcionar adecuadamente. El correcto funcionamiento del instrumental es una parte importante de la garantía de calidad. En este manual presentaremos los lineamientos para el mantenimiento y la estandarización de algunos de los equipos que intervienen en el manejo de muestras clínicas en el laboratorio de microbiología. La finalidad de este documento es servir de guía para la elaboración de protocolos para la evaluación del funcionamiento del instrumental, adaptados al funcionamiento y las necesidades de cada laboratorio.

En general se presentarán para cada aparato:

- Descripción, principio de operación y la utilidad en el laboratorio de microbiología
- Recomendaciones especiales para su utilización y los requerimientos del medio ambiente donde va a ser ubicado (si es que los tiene).
- Insumos o reactivos necesarios para su funcionamiento y mantenimiento.
- Calibración inicial.
- Procedimientos de rutina para su control de calidad.
- Sugerencias para su utilización rutinaria.
- Posibles causas de mal funcionamiento.
- Prototipo de planillas para registro de resultados del control de calidad.

### Recomendaciones generales

Cada instrumento tiene sus propias características y por lo tanto indicaciones específicas de mantenimiento y control de calidad pero hay algunas recomendaciones que son aplicables, en general, a todo el equipamiento del laboratorio.

#### Limpieza de las superficies externas

Para la limpieza del instrumental se pueden utilizar toallas de papel humedecidas con alguna solución desinfectante como alcohol al 70%, desinfectante fenólico correctamente diluido o cualquier otro desinfectante general. Si se usó alguna solución desinfectante, enjuagar con agua. La utilización de alcohol 70% no requiere enjuague posterior ya que no deja residuos. Cuando se usa hipoclorito de sodio para la limpieza de superficies metálicas, se debe tener la precaución de realizar un profundo enjuague para evitar la corrosión de las mismas.

#### Actividades dependientes de la temperatura

Si algún equipo, que funciona con regulación térmica, no se utiliza rutinariamente, el control de calidad de la temperatura se debe realizar cada vez que el mismo se pone en funcionamiento.

Tolerancia recomendada para distintos aparatos con control térmico:

- Estufas de cultivo:  $\pm 2^{\circ}$  C a menos que se requiera una temperatura específica (por ejemplo para pruebas de sensibilidad donde la tolerancia es de  $\pm 1^{\circ}$  C).
- Baños de agua y bloques térmicos:  $\pm 1^{\circ}$  C
- Heladeras: 4-8 $^{\circ}$  C
- Congeladores (Freezer) estándar:  $\pm 5^{\circ}$  C
- Ultracongeladores (temperatura menor que -60 $^{\circ}$  C):  $\pm 10^{\circ}$  C

#### Precauciones eléctricas

La conexión a tierra y la seguridad eléctrica del laboratorio se debe controlar al menos una vez al año o cada vez que se va a conectar un nuevo equipo a la línea de electricidad.

Se recomienda que los equipos de funcionamiento continuo se encuentren conectados a una línea abastecida por un generador eléctrico de emergencia.

Se sugiere que la responsabilidad de cada equipo del laboratorio este asignada a una persona en particular. Esta persona será la encargada de realizar todo el mantenimiento preventivo que el aparato requiera.

## pH-Metro

### Descripción

Es un instrumento diseñado para medir la acidez o la alcalinidad de soluciones. Se compone de un aparato unido mediante un cable eléctrico flexible a un dispositivo sensor (el electrodo). En el aparato central se encuentran los controles de funcionamiento, el amplificador de impedancia y una escala mecánica o digital que indicará el valor del pH registrado. Los nuevos aparatos miniaturizados contienen todos los elementos al final del electrodo.

En los laboratorios de microbiología se suelen utilizar electrodos de combinación que contienen tanto el electrodo de referencia y el sensor de pH dentro del mismo dispositivo. En este manual describiremos el funcionamiento del pH-metro que utiliza el tipo de electrodo descrito.

### Utilización del pH-metro en microbiología

Medición precisa y ajuste del pH de soluciones. Esto es importante en la preparación de soluciones de antimicrobianos porque, en algunos casos, el pH del diluyente ocasiona variaciones considerables en la solubilidad o en la actividad de dichas drogas. Por otra parte tanto las bacterias como los hongos y los virus requieren medios de cultivo y transporte con rangos de pH específicos para mantenerse viables o para desarrollarse. Muchos reactivos empleados para la detección de distintas reacciones metabólicas deben ser preparados con un pH final específico para que dicha reacción sea correctamente detectada e interpretada.

### Ubicación en el laboratorio

1. El aparato se debe ubicar en un lugar fresco y seco, alejado de aparatos que produzcan calor.
2. Se debe conectar a un circuito eléctrico con la correspondiente conexión a tierra.
3. Se debe dejar suficiente espacio alrededor del aparato como para colocar soluciones adicionales, un recipiente para descarte de agua de enjuague, un agitador magnético y una caja de toallas de papel absorbentes para limpieza del electrodo.
4. Se debe ubicar cerca de un armario o cajón donde se puedan almacenar varillas de plástico para agitación, buffers de referencia, diferentes soluciones de NaCl y NaOH (para ajuste del pH), pipetas para el agregado de las soluciones de ácido o álcali y electrodos de repuesto.
5. Mantener las planillas de registro del control de calidad cerca del aparato.
6. Es conveniente colocar el pH-metro próximo a una pileta para descartar fácilmente el agua de deshecho y cerca también de un cesto de basura para arrojar las pipetas descartables utilizadas o las toallas de papel absorbente necesarias para secar el electrodo.

### Precauciones especiales

1. El electrodo nunca debe secarse.
  - a) Cuando no se utiliza el electrodo se debe guardar sumergido en una solución buffer neutra. **No se recomienda el uso de agua destilada o deionizada para el almacenamiento de los electrodos.**
  - b) Si el electrodo se debe guardar por períodos largos, se puede colocar dentro de un tubo de vidrio lleno casi totalmente con una solución de almacenaje específica, según el tipo de electrodo de que se trate. El tubo debe sellarse luego con parafilm para evitar la evaporación de la solución.
  - c) Para el almacenaje corto basta con asegurarse que el capuchón plástico que protege el bulbo del electrodo este lleno de solución buffer.
2. Llenar el electrodo con la solución recomendada hasta el agujero de llenado. Este agujero debe ser tapado durante el almacenaje para evitar evaporación (**pero debe permanecer abierto mientras se está utilizando el pH-metro**). Si hay una protección de la unión líquida del electrodo, se debe retirar al momento de realizar mediciones de pH.
3. Cada vez que sumerja el electrodo en alguna solución (incluso los buffers de calibración o los de almacenaje), enjuague luego con suficiente agua deionizada.

4. La medición de los buffers de referencia y la solución cuyo pH se quiere determinar se debe hacer a la misma temperatura. La mayoría de los pH-metros están preparados para leer a temperatura ambiente (22-25° C). Si es posible se debe permitir que las soluciones alcancen temperatura ambiente antes de medir su pH. Si no es posible debe asegurarse que el control de temperatura este ajustado a la temperatura de la solución a medir. Nunca determine el pH de soluciones cuya temperatura supere o esté por debajo los 100 o 0° C, respectivamente.
5. No utilice electrodos de referencia de plata-cloruro de plata para medir el pH de soluciones buffer Tris (debido a que la solución de llenado puede interactuar con el Tris y cambiar la conductividad llevando a lecturas erróneas). Un electrodo de plata puede recuperarse de la interacción con el Tris pero lleva varias horas. Para medir este tipo de buffers utilice un electrodo de calomel con junta de cerámica. Este tipo de electrodos son, además, los recomendados para medir soluciones que contengan proteínas, iones sulfuros, de metales pesados o fuertemente reductores.
6. No se deben utilizar electrodos de calomel para medir soluciones cuya temperatura esté por encima de los 60° C.
7. No limpie enérgicamente el bulbo del electrodo. El bulbo es sumamente frágil por lo que cualquier rajadura o alteración cambiará el rendimiento de voltaje y de esa manera el resultado de la medición. La limpieza del bulbo se debe realizar con una corriente de agua deionizada y el secado se debe llevar a cabo en forma suave con un paño o papel absorbente que no libere pelusa.
8. Asegurarse de tener a mano materiales absorbentes y soluciones neutralizantes para el caso en que se produzca algún eventual derrame de ácido o álcali.
9. Mantener el aparato en modo "standby". Sólo apague completamente el pH-metro cuando se sepa que no se va a utilizar por largos períodos de tiempo. El aparato generalmente requiere un tiempo de precalentamiento antes de estar listo para su uso.
10. No salga del modo standby hasta que el electrodo se encuentre sumergido en una solución. Operar el electrodo en aires puede descargarlo.
11. Se debe tener mucho cuidado de mantener el bulbo de vidrio del electrodo alejado de la varilla de agitación.
12. Agregar las soluciones reguladoras de ácido o álcali lejos del electrodo. Permitir que la solución se homogeneice perfectamente, por agitación o mezclado durante varios segundos (>15 s), antes de volver a medir el pH.
13. Las soluciones que tienen pHs muy altos o muy bajos o de baja fuerza iónica y no buffereadas o débilmente buffereadas requieren generalmente tiempos de estabilización mayores (superiores a los 15 min).
14. Cuando se va a utilizar un electrodo nuevo se debe retirar el capuchón plástico que cubre la junta líquida y guardarlo para colocarlo nuevamente cuando el electrodo se deba guardar por largos períodos de tiempo o cuando se necesite transportar el electrodo. La junta líquida nunca se debe cubrir cuando el electrodo está en modo standby.

### **Materiales y reactivos necesarios**

#### 1. Buffers de referencia

Se pueden adquirir de fuentes comerciales de distintos fabricantes, el pH de cada uno, no puede tener una variación superior a las 0.02 unidades del valor de pH estipulado. Los buffer de calibración en general son coloreados y los estándares de control de calidad son incoloros.

- a) Se debe tener suficiente cantidad de buffers incluidos en el rango de pH para el cual el instrumento va a ser utilizado.
- b) Los buffers estándares de calibración son de pH 4.00, 7.00 y 10.00. Se debe contar con cantidad extra de buffer pH 7.00 debido a que este es necesario para el guardado del electrodo.
- c) Los buffers certificados para el control de calidad se puede obtener comercialmente en el rango de 1.0 – 11.0

#### 2. Solución de llenado del electrodo (disponible comercialmente)

Para adquirir la correcta solución de llenado del electrodo seguir las instrucciones del fabricante del mismo.

- a) Solución saturada de KCl (4,654 M) para electrodos de calomel  
KCl cristalino  
Agua deionizada

Agregar de a poco el KCl a un volumen de 100 a 250 ml de agua deionizada tibia sobre un agitador magnético con calentamiento. Agite constantemente. Continuar agregando cristales hasta que estos no se disuelvan. Cuando esta solución saturada se enfríe, se deben formar cristales. Esta solución se puede guardar indefinidamente en botellas de vidrio o plásticas a temperatura ambiente.

b) Para electrodos de plata utilizar solución saturada de AgCl in 4 M de KCl (comprar de una fuente comercial).

3. Soluciones ácidas y básicas para ajustar el pH.

a) NaOH (se recomienda utilizar soluciones 0.1, 1.0 y 10.0 N)

b) HCl (se recomienda utilizar soluciones 0.1 y 1.0 N y HCl concentrado)

### Procedimiento de calibración inicial

A. Acondicionar, un electrodo nuevo o que recientemente haya recibido un lavado profundo, por inmersión de al menos 8 horas en una solución buffer de referencia de pH 7.00.

B. Calibrar el aparato cuando se va a poner por primera vez en uso y cada día que se lo va a utilizar. Si el instrumento fue apagado, se debe dejar precalentar al menos 15 min antes de utilizarlo.

1. En modo standby, se debe leer en la pantalla  $7.0 \pm 0.01$ . Si esto no ocurre se debe calibrar nuevamente el aparato.

2. Si el instrumento tiene control de temperatura, se debe asegurar que este se encuentre ajustado a la temperatura que se van a medir las muestras. En la mayoría de los casos se utiliza temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ). **Los estándares de calibración y el líquido al cual se necesita determinar el pH deben estar a la misma temperatura.**

3. Abrir la tapa del agujero de llenado del electrodo.

4. Si el electrodo no se había utilizado previamente retire el capuchón que protege al bulbo. Retire al electrodo del buffer de almacenamiento y enjuague, el bulbo, con una corriente de agua deionizada sobre un recipiente colector del agua de deshecho. Seque suavemente con papel, si lo desea, pero no raspe el bulbo. El electrodo puede quedar mojado con el agua deionizada ya que esta no cambia el pH de las soluciones a medir.

5. Colocar una pequeña cantidad de buffer de calibración pH 7 en un vial plástico y sumerja el electrodo por debajo de la junta.

6. Siga las instrucciones del fabricante para medir el pH, permitir que la lectura se estabilice. El tiempo de estabilización puede variar de acuerdo al sistema. Si la lectura no se estabiliza, indica que puede haber problemas con el electrodo. En este caso no se debe utilizar el pH-metro hasta tanto no se reacondicione el electrodo o se reemplace por otro que funcione correctamente.

7. Una vez que la lectura se estabiliza, se debe ajustar a pH 7.00 según las indicaciones de su pH-metro. Vuelva al modo standby antes de retirar el electrodo del buffer pH 7.00.

8. Enjuague el electrodo con agua deionizada como se indica en el paso 4.

9. Sumerja el electrodo en el buffer de calibración de pH 4.00.

10. Salir del modo standby y permitir que la lectura se estabilice.

11. Ajuste la lectura a pH 4.00. Regrese al modo standby antes de retirar el electrodo del buffer.

12. Enjuague el electrodo con agua deionizada como se indica en el paso 4.

13. Mida nuevamente el buffer de pH 7.00 como se describe en el paso 7 y reajuste la lectura de ser necesario. Proceda de igual forma para el buffer de pH 4.00 (paso 11). No olvide enjuagar el electrodo después de cada medición.

14. Proceda a leer tres veces cada buffer de calibración (pH7.00 y 4.00). Si las lecturas no caen dentro de un rango de variación de 0.05 U después de los tres ajustes, no utilice el pH-metro hasta que el electrodo haya sido reacondicionado o sea reemplazado.

15. Una vez que el pH-metro haya sido calibrado con los buffers de pH 7.00 y pH 4.00, lea el buffer de pH 10.00 como si este fuera una muestra desconocida. Para ello sumerja el electrodo en dicho buffer y salga del modo standby. La medición debería ser  $10.00 \pm 0.1$  U, a esta medición se la llama comprobación de linealidad. El error máximo permitido en este caso es  $\pm 0.1$  U de pH.

16. Coloque nuevamente el electrodo en el buffer de pH 7.00 y permita que se estabilice la lectura.

17. Determine el pH del buffer estándar cuyo valor este más cerca del esperado para la muestra problema. El valor obtenido debe ser el del buffer estándar  $\pm 0.05$  U de pH. No ajuste el pH-metro a este valor; los buffer estándar sólo sirven para evaluar la exactitud del sistema. Si Ud. no puede calibrar el pH-metro, con los buffers de calibración, para que funcione dentro de estas tolerancias, no utilice el aparato hasta que no haya reacondicionado el electrodo o lo haya cambiado.

18. Registre todos los datos de la calibración (pH de cada estándar de calibración y buffers control) en la correspondiente planilla de control de calidad del aparato. Debe consignarse además el nro de electrodo, el nombre de la persona que realizó la calibración y el lote de todas las soluciones calibradoras utilizadas.

19. Antes de guardar el electrodo, coloque el capuchón que protege la junta y tape el agujero de llenado.

## Periodicidad de los controles

### A) Cada vez que se utiliza

1-Calibrar el pH metro con el buffer estándar de calibración de pH=7.00 y el estándar de pH más cercano al esperado para la muestra a probar (4 ó 10), por ejemplo si se espera un pH de 8.2 utilice como segundo buffer de calibración el correspondiente a pH 10.00.

2-Leer y registrar el valor de pH del estándar de calibración opuesto al utilizado en segundo término en el paso 1. Para el ejemplo dado arriba utilice el buffer de calibración de pH 4.00. El resultado debe estar dentro de  $\pm 0.10$  unidades del valor del pH de dicho estándar.

3-Leer y registrar el valor de pH de un buffer de control de calidad certificado, próximo al esperado para la muestra a probar. Para el ejemplo dado arriba, utilice el buffer certificado de pH=8.00. El valor obtenido debe estar comprendido en  $\pm 0.05$  unidades del valor del pH de dicho buffer.

### B) Cada día de uso

1-Observar el nivel de la solución de llenado del electrodo de referencia. No se debe permitir que el mismo sea inferior a la parte de arriba del elemento interno.

2-Limpiar la mesada que rodea al pH metro con un trapo húmedo.

3-Enjuagar el electrodo con agua deionizada, y guardar sumergido en buffer pH=7.00.

4-Controlar que el instrumento esté en modo "standby" cuando no se lo esté utilizando.

## PH-metro: control de calidad de rutina

Control de calidad de rutina	Frecuencia del procedimiento			
	Cada uso	Cada día	Cada semana	Cada mes
Calibración con estándar de pH 7.00 y estándar más cercano al valor de la muestra a procesar.	X			
Lectura y registro del pH del estándar de calibración opuesto al estándar más cercano a la muestra.	X			
Lectura y registro del pH del buffer de control de calidad certificado más próximo al esperado para la muestra a procesar.	X			
Controlar el nivel de la solución de llenado del electrodo de referencia.		X		
Enjuagar el electrodo con agua deionizada; guardar sumergido en buffer pH 7.00. Colocar el instrumento en modo standby.	X	X		
Utilizar buffer pH 7.00 fresco para guardar el electrodo.			X	
Limpiar el área que rodea al Ph-metro		X		
Limpiar el área de abajo y la que rodea al aparato completo.				X
Controlar las conexiones eléctricas				X

### C) Mensualmente

- 1-Limpiar el polvo del instrumento, y la mesada por debajo y alrededor del mismo.
- 2-Controlar las conexiones eléctricas a fin de detectar deterioro en los cables, los enchufes, etc.

### D) Cuando sea necesario

- 1-Lavar y reacondicionar los electrodos (ver abajo).
- 2-Reemplazar los electrodos dañados por otros nuevos.

## Lavado y reacondicionamiento de los electrodos

### Reactivos necesarios

- 1- Solución de llenado apropiada para el electrodo.
- 2- KCl (solución 0.1 N).
- 3- Agua destilada deionizada.

### B) Lavado (el lavado de los electrodos generalmente es llevado a cabo por personal del servicio técnico).

- 1- Utilice un tubo plástico fino y flexible (pej.: cateter) adosado a una jeringa para extraer toda la solución de relleno del electrodo a través del orificio de llenado. Enjuague el electrodo con agua deionizada tibia y luego enjuague con la solución de electrolitos de llenado apropiado (generalmente solución de KCl). Extraiga la solución de electrolitos utilizada para enjuagar y recargue el electrodo a través del orificio de llenado con solución fresca de electrolitos.
- 2- Controle que la unión se vea limpia y blanca y que exista libre flujo a través de ella de manera tal que se permita el secado del electrodo al aire. El libre flujo queda indicado por la cristalización alrededor de la unión.

## Procedimientos para las mediciones especiales

### A) Probar y ajustar el pH manteniendo la esterilidad de la muestra

- 1-Cargar un tubo de boca ancha o un vaso de precipitados con suficiente etanol al 70% para sumergir el electrodo aproximadamente hasta 2.5 cm del orificio de llenado.
- 2-Preparar un tubo de boca ancha o un frasco con agua deionizada estéril.
- 3-Tener disponibles pipetas estériles.
- 4-Después de la calibración inicial, tomar el electrodo por encima del orificio de llenado, y sumergirlo en el alcohol por un mínimo de 1 minuto.
- 5-Sin tocar el electrodo mismo, mantenerlo suspendido sobre un recipiente adecuado y utilizando una pipeta enjuagarlo con agua deionizada estéril.
- 6-No secar, sólo sacudir para eliminar el exceso de agua e inmediatamente sumergirlo en la solución estéril a probar. Determinar el pH de la manera usual.
- 7-Si se desea determinar el pH de otras soluciones estériles, se deben repetir los pasos 4 y 5 entre cada solución.
- 8-Para regular el pH de las muestras probadas, agregar el ácido o el álcali con pipeta estéril; debido a sus pH extremos estos se consideran estériles.

## B) Determinación del pH sobre medios sólidos a base de agar

1-Permitir que el medio solidifique y alcance temperatura ambiente

2-Utilizar un electrodo de superficie; este está específicamente diseñado para medir el pH de superficies de agar.

3-Otra forma de realizar la medición es: macerar una porción del medio solidificado en un pequeño vaso de precipitados con agua deionizada y luego medir el pH como si fuera un medio líquido. Debido a su actividad buffer el medio puede contrarrestar la pequeña acidificación causada por el pH del agua (el agua con el CO<sub>2</sub> del aire forma ácido carbónico que es débilmente ácido).

## C) Determinación del pH de agua destilada o deionizada

Agregar 1 gota de KCl por cada 50 ml del agua a la cual se desea determinar el pH, para aumentar la conductancia eléctrica de la misma, adicionando iones neutros (ni H<sup>+</sup>, ni OH<sup>-</sup>).

## Causas de mal funcionamiento

### A) Generales

1-Limpieza del electrodo.

2-Pérdida de la solución de llenado del electrodo.

3-Diferencia de temperatura entre el electrodo y la solución a probar o entre los estándares de calibración y la solución a probar.

4-Interferencia electrónica.

5-Utilización de solución de llenado incorrecta

6-Utilización de buffers de calibración incorrectos.

7-Contaminación en el buffer o solución de control.

8-Problemas en la conexión entre el electrodo y el cable o entre el cable y la unidad de poder del instrumento.

9-Otros problemas del electrodo.

### B) Problemas del electrodo

Generalmente los problemas del electrodo se manifiestan como retrasos en los tiempos de respuesta, dificultades en la calibración precisa con soluciones buffer de alto y bajo rango de pH, continuas caídas de los valores durante la lectura, etc. En estos casos se recomienda antes que nada, limpiar correctamente el electrodo, reacondicionar, y determinar nuevamente el pH.

**Electrodos de vidrio:** secar cuidadosamente con papel absorbente la membrana de vidrio, y examinar con una lupa la presencia de rajaduras.

### C) Otros problemas

En el caso de que se produzcan inconvenientes relacionados con el tipo de modelo de pH metro, o problemas sin razón aparente, comuníquese con un servicio técnico adecuado.

## PIPETAS

### Principio de funcionamiento

Las pipetas aspiran y descargan por medio de aire o de un mecanismo de desplazamiento positivo. Las pipetas de desplazamiento positivo son en general más exactas para la medición de pequeños volúmenes y en teoría la punta plástica ("tip") no necesita ser reemplazada entre las distintas muestras. En general en microbiología se utilizan las pipetas que funcionan por desplazamiento con aire.

### Descripción

El término "pipetas" describe dispensadores, dilutores y equipos para pipeteo. Las pipetas pueden ser manuales o automáticas y las hay de volumen fijo, variable y modelos multicanal.

Las pipetas manuales son herramientas cilíndricas livianas que consisten en un mango mecánico para ajuste y calibración del volumen y una punta donde se ajusta el "tip" descartable. Las pipetas miden aproximadamente 10 pulgadas (aprox. 25 cm) de largo y dispensan volúmenes que van desde los microlitros hasta los mililitros. En las pipetas automáticas el mango mecánico se reemplaza por instrumentación.

### Exactitud y precisión

- A. La exactitud es la concordancia entre el volumen que marca la pipeta que va a dispensar y la media del volumen real dispensado en varios y controlados eventos. En general se expresa como inexactitud de la herramienta y su valor se da como porcentaje. La inexactitud se puede expresar también como la diferencia entre el valor teórico o esperado y el resultado calculado.
- B. La precisión es la concordancia entre las distintas repeticiones de una misma medición. Esta se expresa generalmente como imprecisión y esta representada por el coeficiente de variación. La imprecisión se puede expresar también como el rango de valores en el cual caen el 95% de las repeticiones.
- C. Relación de la inexactitud e imprecisión con la calibración de pipetas:
  1. La correcta calibración de pipetas requiere del cálculo de ambos parámetros.
  2. Si la pipeta es de volumen variable, la inexactitud e imprecisión se deben calcular para cada volumen y si es modelo multicanal, para cada canal, a menos que las instrucciones del fabricante recomienden otra cosa.

### Utilización de pipetas en microbiología

Las pipetas se utilizan para diluir sueros, para preparar inóculos para las pruebas de sensibilidad, agregar ingredientes a los medios o reactivos, adicionar cantidades exactas de reactivos o muestras durante los procedimientos analíticos, etc. Las ventajas del uso de pipetas radica en que tienen una excelente exactitud y precisión y además son prácticas para dispensar rápidamente pequeños volúmenes de líquidos.

### Factores de calibración

1. Importancia de la calibración.

La medición de volúmenes, utilizando pipetas, es una de las fuentes potenciales de error en los laboratorios clínicos. Pequeños errores de pipeteo pueden causar grandes errores en el resultado final de una prueba. Como vimos anteriormente, en los laboratorios de microbiología, las pipetas se utilizan para diluir sueros, para preparar inóculos para pruebas de sensibilidad, etc.
2. Requerimientos para la calibración de pipetas

Las agencias que inspeccionan laboratorios, como la CAP, requieren una calibración periódica de las pipetas que aseguren la correcta medición de volúmenes.
3. Métodos de calibración disponibles

Existen varios métodos para la calibración de pipetas. Los más utilizados son el método gravimétrico, el espectrofotométrico y el colorimétrico. Otros métodos disponibles pero menos usados son, el radioisotópico, el enzimático y el de titulación ácido-base.

### Métodos para la calibración de pipetas

Método	Instrumento	Bases del sistema	Limitaciones
Gravimétrico	Pipetas (recomendado)	1 ml de agua= 1 gr (ajustado por temp. y presión)	Vol. dispensado debe ser >0.002 ml
Espectro-fotométrico	Pipetas	Absorbancia del dicromato de potasio utilizado para la curva de calibración	Vol. dispensado debe ser >0.01 ml

### Precauciones especiales

- A. Cambio de punta (“tip”) durante el procedimiento de calibración  
Si la pipeta es usada para dispensar varias alícuotas del mismo líquido (pej. Buffers o reactivos) o para transferir una alícuota de distintos líquidos (pej. Sueros), utilice la misma punta para todas las mediciones durante el procedimiento de calibración. Nota: para el pipeteo de soluciones en la rutina utilice una punta diferente para cada solución.
- B. Preenjuagado del “tip”  
Preenjuagado es el prehumectado del interior de la punta con el líquido que se va a pipetear. Se logra por aspiración de una alícuota del líquido dentro del tip y luego dispensarlo dentro del recipiente original o bien descartarlo. El preenjuagado mejora la uniformidad y precisión por proveer superficies de contacto idéntico para todas las alícuotas.
  - 1) Si la pipeta se utiliza normalmente para dispensar alícuotas repetitivas del mismo líquido, se debe preenjuagar la punta al comienzo antes de empezar a dispensar la primer alícuota.
  - 2) Si en cambio se va a utilizar para medir una alícuota de distintos líquidos, el preenjuagado puede no ser necesario.

### Condiciones ambientales para la calibración de pipetas

- A. Control de temperatura
  - 1) La temperatura de las pipetas a ser calibradas debe ser la misma que el aire del ambiente, el líquido de prueba y los otros equipos intervinientes ( $\pm 0.5^\circ \text{C}$ ).
  - 2) La temperatura de calibración debe ser lo más cercana posible a la que se va a operar la pipeta.
  - 3) Mantener estable la temperatura durante todo el procedimiento.
- B. Factores ambientales varios
  - 1) Mantener la humedad relativa entre 45 y 75%. Esto limita la evaporación y la acumulación de electricidad estática.
  - 2) Utilice agua tipo I o II (según criterios de NCCLS) para asegurarse que las impurezas no afecten la densidad de agua.
  - 3) El agua no debe contener burbujas visibles ya que estas afectan el volumen medido.

### Frecuencia de calibración

- 1. Guías propuestas por el NCCLS para la frecuencia de calibración de pipetas
  - a) El NCCLS recomienda que se calcule, mediante una prueba de 10 muestras, la exactitud y precisión de una nueva pipeta, después del mantenimiento preventivo o al menos cuatrimestralmente. Esto implica 10 determinaciones separadas por sistema es decir uno por cada canal de una pipeta multicanal o por cada medida que puede dispensar una pipeta de volumen ajustable.

- b) NCCLS también recomienda una comprobación rápida utilizando una prueba de cuatro muestras para calcular la exactitud. Esta determinación se debe hacer mensualmente.

2. En la tabla se muestran un esquema sugerido para la frecuencia de calibración de pipetas. En general, las pipetas utilizadas en los laboratorios de microbiología y serología no son usadas para medir volúmenes críticos y por ello suelen no requerir un esquema de calibración tan riguroso como el propuesto por el NCCLS. No se cuenta con guías del NCCLS sobre la frecuencia de calibración de pipetas de uso poco frecuente o que se utilicen para medir volúmenes no críticos.

- Determinar la frecuencia de calibración de cada pipeta de acuerdo a su uso. Las pipetas usadas diariamente requieren calibraciones más frecuentes que las que se utilizan una vez a la semana o al mes.
- Las pipetas utilizadas para medir volúmenes críticos requieren una calibración más frecuente que las que se usan para medir volúmenes aproximados.
- Rotular correctamente las pipetas que se utilizan para medir volúmenes aproximados para no confundirlas con las que se usan para propósitos más exactos.

### Esquema de calibración sugerido para las pipetas utilizadas en el laboratorio de microbiología

Uso de la pipeta	Esquema de calibración <sup>a</sup>			
	Pipeta nueva o después del mantenimiento	Mensualmente	Cuatrimens-tralmente	Anualmente
Medición de vol. crítico <sup>b</sup>				
Uso semanal o mensual	<b>A, P</b>		<b>A</b>	<b>P</b>
Uso diario	<b>A, P</b>	<b>A</b>		<b>P</b>
Medición de vol. <b>no</b> crítico <sup>c</sup>				
Uso semanal o mensual	<b>A, P</b>			<b>A, P</b>
Uso diario	<b>A, P</b>		<b>A</b>	<b>P</b>

<sup>a</sup> A, prueba de exactitud; P, prueba de precisión

<sup>b</sup> El agregado de algunos reactivos a ciertos ensayos requiere la medición de volúmenes críticos

<sup>c</sup> Generalmente no se requiere la medición de volúmenes críticos para diluciones de suero, cultivos cuantitativos, inóculos para pruebas de sensibilidad, agregado de ingredientes a medios o reactivos, agregados de reactivos a procedimientos analíticos o colocación de muestra a los preparados para teñidos fluorescentes.

### Calibración por método gravimétrico

#### Materiales e insumos

- Reactivos
  - Agua destilada: NCCLS tipo I o II

#### Especificaciones del agua tipo I y II según NCCLS

Parámetro	Especificaciones	
	Tipo I	Tipo II
Conductividad a 25° C máximo en $\mu\text{mhos/cm}$	<b>0.1</b>	<b>0.5</b>
Resistividad a 25° C mínimo en Mohms-cm	<b>10</b>	<b>1.0</b>
pH a 25° C	<b>NA</b>	<b>NA</b>
Silicatos (mg/lit) máximo	<b>0.05</b>	<b>0.1</b>
Bacterias (UFC/ml) máximo	<b>10</b>	<b>10<sup>3</sup></b>
Carbono orgánico total máximo en (mg/lit)		<b>NA</b>

NA, no aplicable

- Equipamiento
  - Balanza analítica, capaz de pesar con exactitud hasta 0.001mg (1.0  $\mu\text{g}$ )
  - Termómetro calibrado a 0.1° C

Recipiente para la pesada de vidrio no poroso, plástico o metal. La boca del recipiente debería ser lo más pequeña posible y se debe utilizar una tapa para evitar la evaporación del agua destilada durante el procedimiento de pesada. Maneje el recipiente con pinzas o con guantes lavados.

### Procedimiento

1. Registre la temperatura antes de comenzar la calibración
2. Tare el recipiente de pesada
3. Si es necesario enjuague el "tip" con agua destilada
4. Deposite una alícuota de agua destilada dentro del recipiente de pesada
5. Coloque nuevamente la tapa del recipiente.
6. Registre el resultado de la pesada en la planilla de control
7. Deposite las otras alícuotas (4 para la prueba de inexactitud y 10 para la prueba de imprecisión). Registre el peso después del agregado de cada alícuota. Luego de concluidas todas las pesadas calcule el peso neto de cada alícuota.

### Cálculos

1. Utilice la planilla de control
2. Calcule el peso promedio ( $W_p$ ) a partir de la pesada de cada alícuota ( $W_i$ ) y el número de pesadas ( $n$ ).

$$W_p = \frac{\sum W_i}{n}$$

3. Calcule el valor promedio del volumen ( $V_p$ ) utilizando el peso promedio ( $W_p$ ) y el factor Z, que tiene en cuenta la variación de densidad del agua resultante de la temperatura, presión atmosférica y los cambios de humedad relativa.

$$V_p = (W_p)(Z)$$

El factor Z se calcula utilizando el apéndice que se presenta a continuación. Un valor estándar de Z calculado teniendo en cuenta la temperatura ambiente y la presión barométrica promedio, se puede utilizar en los cálculos de calibración de pipetas que se utilizarán para medir volúmenes **no** críticos. Si se están calibrando pipetas usadas para medir volúmenes críticos, se debe calcular el valor exacto de Z teniendo en cuenta la temperatura y presión atmosférica al momento de la calibración.

5. Calcular la inexactitud ( $E_p\%$ ) utilizando el volumen promedio ( $V_p$ ) y el volumen nominal ( $V_0$ ).

$$E_p\% = \frac{V_p - V_0}{V_0} \times 100$$

6. Calcular la imprecisión (CV%) utilizando los pesos individuales ( $W_i$ ), el peso promedio ( $W_p$ ) y el número de pesadas ( $n$ ).

$$CV\% = 100 \times \frac{\sqrt{\frac{\sum (W_i - W_p)^2}{n-1}}}{W_p}$$

### Tolerancia

1. Tolerancia

El límite de tolerancia para la exactitud y la precisión de las pipetas, depende de la aplicación que se le de al instrumento dentro del laboratorio. La mayoría de las recomendaciones sobre límites de tolerancia están dados para pipetas que se utilizan para dispensar volúmenes críticos, como las usadas en laboratorios de química clínica.

Los límites de tolerancia para pipetas pueden ser ajustados por cada usuario. En la tabla que se presenta a continuación se puede encontrar una lista de tolerancias sugeridas para usos comunes de pipetas en el laboratorio de microbiología.

2. Acción correctiva

- a) Si el volumen dispensado por la pipeta no cae dentro de los límites de tolerancia sugeridos, se debe proceder a su ajuste (en el laboratorio o remitir al fabricante), comenzar a utilizarla para medición de volúmenes menos críticos o directamente descartarla.

- b) Si se procede al ajuste de la pipeta se debe realizar posteriormente la determinación de la exactitud y precisión mediante el ensayo de 10 determinaciones como se explicó anteriormente.

#### Límites de tolerancia sugeridos para pipetas utilizadas en microbiología

Uso de la pipeta	Inexactitud (%)	Imprecisión (%)
Medición de volúmenes críticos		
Mediciones <50 µl	<b>± 2</b>	<b>± 2</b>
Mediciones >50 µl	<b>± 1.5</b>	<b>± 1</b>
Medición de volúmenes <b>no</b> críticos		
Colocación de muestras a preparados para teñidos con fluorescencia	<b>± 10</b>	<b>No es necesaria</b>
Otros usos	<b>± 2</b>	<b>± 2</b>

#### Valores de Z en función de la temperatura y la presión para agua destilada.

Temp (°C)	Z a una presión (mm Hg) de:					
	600	640	680	720	760	800
15	1.0018	1.0018	1.0019	1.0019	1.0020	1.0020
15.5	1.0018	1.0019	1.0019	1.0020	1.0020	1.0021
16	1.0019	1.0020	1.0020	1.0021	1.0021	1.0022
16.5	1.0020	1.0020	1.0021	1.0022	1.0022	1.0023
17	1.0021	1.0021	1.0022	1.0022	1.0023	1.0023
17.5	1.0022	1.0022	1.0023	1.0023	1.0024	1.0024
18	1.0022	1.0023	1.0024	1.0024	1.0025	1.0025
18.5	1.0023	1.0024	1.0025	1.0025	1.0026	1.0026
19	1.0024	1.0025	1.0025	1.0026	1.0027	1.0027
19.5	1.0025	1.0026	1.0026	1.0027	1.0028	1.0028
20	1.0026	1.0027	1.0027	1.0028	1.0029	1.0029
20.5	1.0027	1.0028	1.0028	1.0029	1.0030	1.0030
21	1.0028	1.0029	1.0030	1.0030	1.0031	1.0031
21.5	1.0030	1.0030	1.0031	1.0031	1.0032	1.0032
22	1.0031	1.0031	1.0032	1.0032	1.0033	1.0033
22.5	1.0032	1.0032	1.0033	1.0033	1.0034	1.0035
23	1.0033	1.0033	1.0034	1.0035	1.0035	1.0036
23.5	1.0034	1.0035	1.0035	1.0036	1.0036	1.0037
24	1.0035	1.0036	1.0036	1.0037	1.0038	1.0038
24.5	1.0037	1.0037	1.0038	1.0038	1.0039	1.0039
25	1.0038	1.0038	1.0039	1.0039	1.0040	1.0041
25.5	1.0039	1.0040	1.0040	1.0041	1.0041	1.0042
26	1.0040	1.0041	1.0042	1.0042	1.0043	1.0043
26.5	1.0042	1.0042	1.0043	1.0043	1.0044	1.0045
27	1.0043	1.0044	1.0044	1.0045	1.0045	1.0046
27.5	1.0044	1.0045	1.0046	1.0046	1.0047	1.0047
28	1.0046	1.0046	1.0047	1.0048	1.0048	1.0049
28.5	1.0047	1.0048	1.0048	1.0049	1.0050	1.0050
29	1.0049	1.0049	1.0050	1.0050	1.0051	1.0052
29.5	1.0050	1.0051	1.0051	1.0052	1.0052	1.0053
30	1.0052	1.0052	1.0053	1.0053	1.0054	1.0055

# Calibración de pipetas

## Método Gravimétrico

**Frecuencia** (marque según corresponda):

Inicial  Semanalmente  Mensualmente  Trimestralmente

**Motivo de la calibración** (marque según corresponda):

Control de exactitud  Control de precisión

**Fecha:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Iniciales del operador:** \_\_\_\_\_

**Tipo de pipeta:** \_\_\_\_\_

**Número de pipeta:** \_\_\_\_\_

**Tamaño de pipeta ( $\mu$ l):** \_\_\_\_\_

**Valor Z:** \_\_\_\_\_

### Valores estadísticos

Muestra N°	Peso de la muestra (mg)	Resultado	Limite de Tolerancia
1	_____		
2	_____	<b>Inexactitud</b>	_____
3	_____		
4	_____	<b>Imprecisión</b>	_____
5	_____		
6	_____	<b>Aceptable</b>	<b>Si</b> <input type="checkbox"/> <b>NO</b> <input type="checkbox"/>
7	_____		
8	_____		
9	_____		
10	_____		

**Acción correctiva:** \_\_\_\_\_

**Revisado por:** \_\_\_\_\_ **Fecha:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## CONTROL de AUTOCLAVE

### I - Principio y descripción

#### Principio de esterilización por vapor

El calor mata a los microorganismos mediante la desnaturalización irreversible de sus enzimas y proteínas estructurales. El tiempo necesario depende de la resistencia del microorganismo al calor y las condiciones de esterilización. Las esporas son la forma microbiana de mayor resistencia al calor, razón por la cual se las utiliza para controlar el funcionamiento del autoclave. La muerte ocurre más rápidamente en aire saturado con vapor que en calor seco porque la temperatura a la cual ocurre la desnaturalización de las proteínas es inversamente proporcional a la cantidad de humedad presente. El número de organismos viables decrece en forma geométrica a medida que aumenta el tiempo en contacto con el aire saturado con vapor. La presión en el autoclave facilita el control de la temperatura a la cual el agua pasa a vapor; a mayor presión, mayor debe ser la temperatura para que el agua se vaporice. A mayor temperatura, más corto será el ciclo de esterilización necesario para alcanzar niveles de muerte aceptable.

#### Descripción General

El autoclave es un instrumento para descontaminación de materiales estables al calor por método físico. Permite que se alcancen y mantengan durante el tiempo óptimo de exposición las condiciones de calor, presión y atmósfera necesarios para alcanzar la esterilización de agentes biológicos.

#### Usos del Autoclave en Microbiología

- ♣ Esterilización de instrumentos limpios, materiales envueltos y recipientes.
- ♣ Esterilización de medios de cultivo.
- ♣ Esterilización de material contaminado antes que sea descartado o lavado. Este proceso no afecta la radioactividad o toxicidad química de los materiales autoclavados.

### II - Consideraciones Generales y Precauciones Especiales.

- Es conveniente contar con un sistema que remueva del ambiente todo el vapor y olores generados.
- Colocar el autoclave en un área separada de las áreas donde se realiza el trabajo microbiológico de rutina, excepto preparación de medios o lavado de material.
- Todo material que se autoclavó y debe ser descartado debe tener un cartel que indique que ha sido sometido al proceso de esterilización. Se acepta cualquier indicador visual, tal como un indicador de temperatura u otro dispositivo que indique que se llevó a cabo la descontaminación.

#### Precauciones

- \* Permita que la presión del autoclave llegue a "0" y la temperatura descienda por debajo de 60 ° C antes de abrirlo.
- \* Tome las precauciones necesarias al abrir el autoclave de tal manera de evitar los primeros vapores eliminados.
- \* Permita que el contenido del autoclave se enfríe durante 20 min. antes de retirarlo. Utilizar guantes resistentes al calor.
- \* Nunca llene los envases que contengan líquido en más de sus dos terceras partes para evitar que el líquido rebalse durante el proceso.
- \* Retire con cuidado los envases con material fundido o líquido ya que cambios bruscos en la temperatura pueden provocar rupturas y derrame de material caliente.

- \* Nunca autoclave tubos o frascos con su tapa ajustada ya que pueden estallar o la esterilización puede no ser completa si el vapor no ingresa al recipiente. En recipientes con tapa a rosca, después de ajustar la misma, desenrosque 180 ° .
- \* Coloque las bolsas con material contaminado con los extremos abiertos de tal manera de tratar de maximizar la penetración del vapor. Si se utiliza contenedores de metal, la base de estos debe tener perforaciones que permitan el flujo de aire durante el autoclavado. Alternativamente agregue 3-6 cm de agua al contenedor antes de colocar la bolsa a autoclavar. Esto permitirá que haya una fuente de vapor dentro del contenedor.
- \* La bolsa no tiene que quedar muy ajustada dentro del contenedor, de lo contrario el vapor no va a penetrar dentro del mismo.
- \* Nunca llene las bolsas a autoclavar en más de sus tres cuartas partes. Antes de cerrar las bolsas agregue una taza (300ml) de agua a cada una para asegurar que se genere suficiente vapor.

### III Insumos necesarios.

#### Monitores físicos:

- Sensor de temperatura: Registra la temperatura dentro del autoclave durante el proceso.
- Manómetros: Registra la presión atmosférica dentro del autoclave.

#### Indicadores químicos:

Monitorea el cambio químico, inducido por calor, en el color o consistencia de la sustancia indicadora. Sólo marca que se alcanzó una temperatura mínima dentro de la cámara. Esta reacción tiene lugar en la superficie del indicador y no asegura la penetración del calor al interior del elemento a autoclavar.

- a) Papeles o tiras impregnadas con indicadores químicos: El cambio de color indica que el esterilizador está trabajando apropiadamente.
- b) Indicadores para autoclave: se trata de tiras adheridas fuertemente a la superficie del elemento a autoclavar. Cuando se alcanza el calor predeterminado aparecen líneas oscuras en diagonal sobre el indicador. Podría no indicar esterilidad, sólo asegura que se alcanzó cierta temperatura pero no el tiempo durante el cual la temperatura se mantuvo.

#### Indicadores Biológicos:

Controlan el proceso de esterilización basándose en la muerte de las esporas resistentes al calor de *Bacillus stearothermophilus* originada por condiciones adecuadas de autoclavado. Esporas de *Bacillus subtilis* no resistentes al calor actúan como control de la prueba de viabilidad. El crecimiento de los microorganismos produce ácidos metabólicos que provocan el cambio de color de un indicador de pH o crea una suspensión visualmente turbia en el medio de cultivo. La falta de crecimiento de las esporas resistentes al calor verifica que el ciclo de autoclavado fue adecuado.

- Ampollas con esporas de *Bacillus* e indicador púrpura para indicar crecimiento.
- Tiras de papel impregnadas con esporas de *Bacillus*. Después del ciclo de autoclavado las tiras se incuban en caldo para verificar presencia o ausencia de crecimiento. Siempre usar tiras sin autoclavar para controlar la viabilidad de las esporas expuestas al autoclave.

#### Envoltorio y contenedores para objetos a autoclavar:

- Telas tipo lino para aquellos elementos que deben ser envueltos.
- Cuando no se dispone de telas se puede utilizar papeles estables al calor y permeables al vapor.

- Se pueden usar bolsas autoclavables para material peligroso que requiere autoclavado previo a su descarte. El color rojo es utilizado universalmente para indicar material contaminado.
- Contenedores: generalmente están hechos de acero inoxidable o polipropileno. Se autoclavan con la parte superior abierta para permitir el desplazamiento del aire. El plástico no conduce el calor de la misma forma que el metal o el vidrio por lo que los tiempos de autoclavado deben ser extendidos.

#### **Materiales para limpieza:**

- Detergentes domésticos.
- Lana de acero

#### **IV Operación de Rutina**

1. Llenar el autoclave de tal forma de facilitar el flujo de aire, la máxima circulación de vapor y la penetración del mismo en los contenedores.
2. Si es necesario apilar los elementos a esterilizar hágalo de tal forma que el vapor pueda circular libremente entre ellos.
3. Deje aproximadamente 5 cm de espacio entre objetos y entre los objetos y las paredes o la puerta del autoclave.

#### **A- Esterilización de medios y soluciones**

1. Use un indicador químico para monitorear cada carga.
2. Comience a medir el tiempo de esterilización a partir del momento en que la temperatura alcanza 121 °C. Se sugieren los siguientes tiempos: para un frasco de 500 ml, 18 min; para uno de 1000ml, 21min, aumentando 3 min por cada 500ml.
3. Siga las instrucciones del fabricante en cuanto al tiempo y temperatura requeridos por cada medio ya que muchos medios de cultivo tienen requerimientos específicos.

#### **B- Esterilización de líquidos (agar y caldos)**

1. Controlar que todas las tapas estén flojas.
2. Nunca llene el recipiente mas de las dos terceras partes.
3. Cierre el autoclave y comience el ciclo. Espere hasta que los indicadores de presión y temperatura estén funcionando. Una vez que finalice el ciclo, la presión llegue a cero y la temperatura caiga por debajo 60°C, abra lentamente el autoclave, evitando el vapor.
4. Usando guantes, retire los recipientes autoclavados con cuidado. Cambios bruscos en la temperatura podrían causar roturas de vidrio o provocar la ebullición del contenido de los recipientes.

#### **C- Materiales secos, envueltos.**

1. Ubique los objetos de tal forma de permitir la máxima circulación de vapor. Ningún objeto debe tocar la pared del autoclave.
2. Cierre el autoclave y comience el ciclo. Asegúrese que los indicadores de presión y temperatura alcancen las condiciones necesarias.
3. Cuando la presión haya caído a cero y la temperatura llegue a 60°C, abra el autoclave usando guantes y protección para los ojos.

#### **D- Esterilización de materiales contaminados.**

1. Transporte el material contaminado en doble bolsa con etiqueta de bioseguridad.
2. Antes de autoclavar las bolsas, desate el nudo de las mismas para asegurar penetración del vapor o agregue una taza de agua a las bolsas cerradas.
3. Coloque las bolsas en bandejas o rejillas para autoclave para evitar que el agar fundido obstruya el drenaje del autoclave.
4. Coloque en cada objeto un indicador químico que garantice que el objeto ha sido autoclavado.
5. Utilice semanalmente un control biológico de esterilización.

#### **V. Control de Calidad y Mantenimiento.**

Se debe registrar las temperaturas alcanzadas en el interior del autoclave colocando termómetros de máxima y comparar con el termómetro del equipo. Documentar las desviaciones y las medidas correctivas que se adoptaron.

Los autoclaves deben tener rangos de tolerancia de temperatura especificadas para cada ciclo. Por ejemplo: la tolerancia para uno de los ciclos más empleados en Microbiología (121° C/ 15 min) es +/- 1° C.

##### **A- Cada ciclo:**

1. Registre la temperatura y tiempo de esterilización.
2. Utilice un indicador químico para asegurar que se han alcanzado las condiciones mínimas. Es conveniente colocar indicadores en varias posiciones de la cámara de autoclave, sobre todo en el centro de la carga, para asegurar que todo el material estuvo expuesto a las mismas condiciones.

##### **B- Semanalmente:**

1. Revise la válvula de seguridad para verificar que la liberación de presión esta funcionando.
2. Incluya un indicador biológico de esterilidad en uno de los ciclos de rutina.

##### **C-Cuando sea necesario:**

1. Limpie las superficies externas.
2. Limpie de desperdicios el drenaje.

Limpie las juntas de la puerta y de la cámara para remover material acumulado.

## **CENTRIFUGAS**

### **I. Principio y Descripción**

#### **A. Principio**

Genera fuerza centrífuga haciendo girar materiales alrededor de un polo central.

#### **B. Descripción**

- 1) La centrífuga consiste de un motor, el cual está ubicado en la base de la unidad, unido a un eje central que se extiende verticalmente y un rotor sobre dicho eje que contiene el material a centrifugar.

- 2) El rotor esta ubicado en un compartimiento (sirve como campo de seguridad y reduce la fricción) con una tapa en la parte superior.
- 3) El motor hace girar el eje y éste, a su vez, hace girar el rotor en forma circular.
- 4) Los materiales a ser centrifugados se colocan en tubos denominados adaptadores o "camisas" ubicados en el extremo del rotor.
- 5) Tipos de Centrifugas:

- Rotor Horizontal: las camisas de la centrifuga no son fijas para que se posicionen horizontalmente bajo una fuerza centrífuga máxima.
- Rotor de ángulo fijo: el rotor esta unido al eje de tal forma que los tubos se pueden colocar dentro de las camisas en un ángulo predeterminado. Pueden alcanzar velocidades mayores que las centrifugas de rotor horizontal.
- Microcentrifugas: ejercen máxima fuerza sobre microtubos. El rotor es de ángulo fijo.
- Citocentrífuga
- Centrifugas con control de temperatura: ej: refrigeradas.
- Ultracentrifugas. Alcanza muy altas velocidades.
- Centrifugas para ubicar en la mesada de laboratorio o centrifugas de pie.

6)Funciones comunes a la mayoría de las centrifugas:

- Perilla para seleccionar las revoluciones por minuto (rpm).
- Perilla para seleccionar el tiempo de centrifugación.
- Control de sistema de frenado.
- Las centrifugas refrigeradas cuentan con registro de la temperatura interna.

### C. Productos del procedimiento de centrifugación:

- Pellet o sedimento: componentes de la muestra que quedan en el fondo después de la centrifugación (pueden ser compactos y requerir resuspensión en un pequeño volumen de diluyente).
- Sobrenadante: se llama a la solución que se encuentra sobre el pellet.

### D. Usos en el laboratorio de Microbiología.

- Concentración de agentes etiológicos y células:
  - Líquidos de punción previo al gram y cultivo. El sedimento se usa para coloraciones y cultivo y el sobrenadante para detección de antígenos y pruebas serológicas.
  - Concentración de micobacterias con o sin descontaminación previa. Generalmente se necesita centrifugación prolongada.
  - Centrifugación diferencial: proceso utilizado para enriquecer ciertas poblaciones celulares (ej: Isolator para Hemocultivos por lisis centrifugación). No todas las partículas sedimentan al pellet. La concentración puede ocurrir también en la capa que se encuentra sobre el pellet o en capas aún superiores.
- Remoción de materia particulada: ej: eliminar células y bacterias de fluidos biológicos para búsqueda de antígenos bacterianos o fúngicos.
- Separación de materiales presentes en una suspensión en base a la diferencia de densidad.

## II. Precauciones y Consideraciones

- **EQUILIBRAR LA CARGA**: si hay excesiva vibración se pueden romper tubos o puede resuspenderse el sedimento durante la desaceleración.

- Limpie todos los derrames de material infeccioso inmediatamente con una solución de hipoclorito de sodio 10 %, desinfectantes fenólicos u otra solución apropiada. Recuerde que todo material que se derrama en el interior de la centrifuga puede aerosolizarse constituyendo un riesgo para adquirir enfermedades infecciosas. Enjuague bien todas las superficies después de desinfectarlas.
- Si conoce el material infeccioso a centrifugar (ej: muestras para concentración y cultivo de micobacterias), use tubos plásticos irrompibles con tapa de tal forma de evitar aerosoles.
- Si abre la centrifuga y ve que un tubo conteniendo material altamente infeccioso se rompió:
  - Trate de contener la respiración.
  - Cierre la tapa de la centrifuga.
  - Todo el personal debe salir del área y cerrar la puerta.
  - Permita que los aerosoles sedimenten al menos 30 min.
  - Entrar con el equipo de seguridad adecuado y limpiar el derrame.
- Si escucha que un tubo se rompe durante el funcionamiento de la centrifuga, apáguela y permita que ésta se detenga antes de abrirla.
- Nunca centrifugue grandes volúmenes de líquidos inflamables porque pueden volatilizarse y afectar el motor.
- Espere que la centrifuga se detenga por completo antes de retirar las muestras.
- Si el material a centrifugar se puede alterar por el calor generado durante el proceso realizado a temperatura ambiente, use una centrifuga refrigerada.
- Ubique la centrifuga en un lugar del laboratorio donde se pueda acceder fácilmente, y el ruido no disturbe demasiado.
- Ubique la centrifuga sobre una superficie nivelada, dejando suficiente lugar a cada lado de la misma para colocar los tubos a centrifugar y aquellos que sirvan para equilibrar.

### III. Calibración Inicial.

Debe ser realizada por fabricante. La calibración de la velocidad de rotación debe ser realizado por el fabricante.

### IV. Control de Calidad.

#### A. En cada uso:

1. Revise la carga, ésta debe estar correctamente balanceada en distribución y peso.
2. Si usa centrifuga refrigerada, controle la temperatura durante la operación.
3. Limpie cualquier salpicadura inmediatamente.

#### B. Diariamente:

1. Si utiliza una centrifuga refrigerada que se apaga todas las noches, abra la tapa para permitir que se seque. Durante el día cuando la unidad está bajo refrigeración deje la tapa cerrada para evitar condensación.
2. Limpie el interior con una solución desinfectante y enjuague bien.

### **C. Semanalmente:**

1. Limpie el interior de la centrífuga con desinfectante. Si se visualiza un anillo en la parte superior del interior de la unidad debido a material derramado, limpie hasta que éste que no queden residuos.
2. Si se centrifugan materiales que contienen bromuro de etidio, revise el interior de la unidad con luz U.V. Si observa un anillo fluorescente en el borde superior, limpie con abundante solución blanqueadora hasta que la fluorescencia desaparezca.

### **D. Mensualmente:**

1. Si usa una centrífuga refrigerada limpie los condensadores refrigerantes, ventilación y filtros.
2. Revise los "carbones" si la centrífuga se utiliza mucho.
3. Revise las conexiones eléctricas.
4. Opcional: Revise la calibración de la velocidad con un tacómetro fotoeléctrico.

### **E. Semestralmente:**

1. Si usa una centrífuga refrigerada controle la temperatura con un termómetro calibrado.
2. Revise los "carbones" si el uso de la centrífuga es moderado.
3. Opcional: Revise la calibración de la velocidad con un tacómetro fotoeléctrico.

### **F. Anualmente:**

1. Calibración de la velocidad por el servicio técnico.

## **V. Operación de rutina.**

1. Equilibre la carga por distribución y peso. Se recomienda equilibrar dentro de los 0.5 g. Esto previene el deterioro del motor y además asegura una mejor separación del material. Distribuya los tubos simétricamente alrededor del rotor, todos los tubos deben tener uno opuesto del mismo tipo y peso.
2. Determine la velocidad, el tiempo y la temperatura (ej: si la centrífuga es refrigerada).
3. Cierre y trabaje la tapa.
4. Encienda la centrífuga. Si tiene ajuste de velocidad manual, aumente lentamente la misma hasta llegar a las revoluciones por minuto (rpm) deseadas.
5. Si detecta excesiva vibración, apague el instrumento inmediatamente para evitar roturas.
6. Permita que la centrífuga se detenga por completo antes de abrir la tapa.

## **CABINA DE BIOSEGURIDAD**

### **I-PRINCIPIO Y DESCRIPCIÓN**

#### **A-Principio**

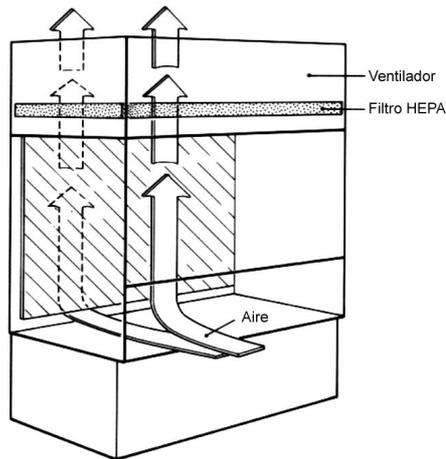
Las cabinas de bioseguridad son equipos diseñados para prevenir aerosoles infecciosos. La mayoría también protege los materiales de trabajo de la contaminación ambiental. Su funcionamiento está basado en los principios de flujo laminar, presión de aire negativa y filtración de aire particulado de alta eficiencia, "HEPA". El flujo laminar emplea láminas que mueven aire para transportar partículas hacia un área de descontaminación (un incinerador) o un filtro para partículas.

La presión de aire negativa asegura que el aire sea introducido a través de las aberturas de la cabina, previniendo el escape de agentes infecciosos. La filtración HEPA se usa para remover las partículas ambientales en el área de trabajo y es el método usual para contener las partículas infecciosas generadas en la cabina.

## B-Clases de Cabinas de Bioseguridad

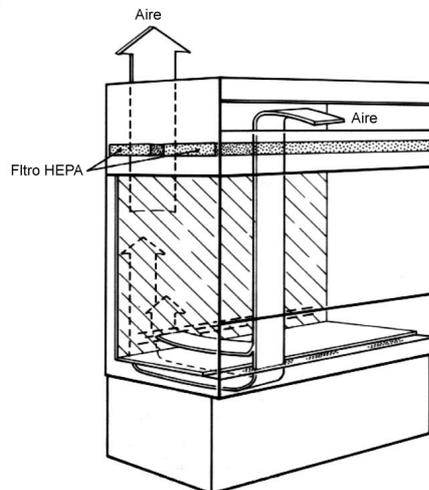
### 1. Clase I

- Presión negativa que protege sólo al operador y al ambiente.
- El aire no filtrado de la habitación entra por el frente de cabina por lo que el área de trabajo es susceptible a contaminación.
- El aire que ingresa a la cabina es filtrado para remover las partículas infecciosas antes de ser liberado al exterior.
- El agregado de un panel de metal para guantes y el aumento de la velocidad del flujo de aire incrementan la protección del operador



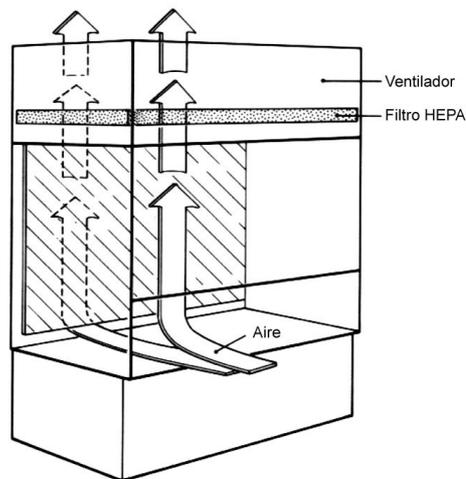
### 2. Clase II

- La filtración del aire protege la muestra de la contaminación ambiental. El paso de aire a través de los filtros HEPA, previo a su liberación, protege al medio ambiente de partículas infecciosas. El flujo de aire laminar y la presión negativa de la cabina protegen al operador.
- Se pueden definir cuatro tipos de cabinas de clase II de acuerdo a los patrones de flujo de aire.
  - Clase II-A: pueden eliminar el aire filtrado directamente al laboratorio o pueden estar conectados a un sistema de conductos. En ambos casos recirculan el 70 % del flujo de aire.
  - Clase II-B1: Eliminan el aire filtrado al exterior y recirculan el 30% del flujo de aire.
  - Clase II-B2: Eliminan el aire filtrado sin recirculación del mismo.
  - Clase II-B3: Eliminan el aire filtrado al exterior y recirculan el 70% del flujo de aire.



### 3. Clase III

- a) Las cabinas completamente cerradas ofrecen máxima protección para el trabajador y el ambiente contra agentes altamente infecciosos.
- b) La filtración HEPA del aire suministrado protege el material dentro de la cabina de la contaminación ambiental.
- c) Los materiales son manipulados dentro de la cabina mediante guantes unidos a la misma.
- d) Todo el aire que es eliminado de la cabina es filtrado a través de dos filtros HEPA antes de ser liberado al exterior.
- e) Sólo es requerida para trabajar con material altamente infeccioso.



### C- Principio de Cabinas de flujo laminar de Clase II.

Retienen el aire con partículas potencialmente infecciosas dentro de la cabina. Estas partículas son removidas del flujo de aire a través de filtros de fibra de vidrio.

#### 1-Filtros HEPA

- a) Los filtros de fibra de vidrio remueven efectivamente partículas de cualquier tamaño. Las partículas menores de  $0.3 \mu\text{m}$  de diámetro son retenidas por difusión mientras que las de mayor tamaño son retenidas por las fibras de vidrio.
- b) La eficiencia para partículas de  $0.3 \mu\text{m}$  de diámetro es mayor de 99.97%.
- c) El aire que ingresa al área de trabajo es previamente filtrado para eliminar las partículas infecciosas.
- d) El aire potencialmente contaminado por aerosoles generados en el área de trabajo es filtrado antes de ser recirculado o eliminado.

## 2-Patrones de flujo de aire

- a) El aire del ambiente entra a la cabina (pero no en el área de trabajo) a través de la ventana frontal.
- b) Un flujo de aire filtrado forma una barrera entre la ventana y el área de trabajo de la cabina lo cual previene la liberación de partículas infecciosas a partir del área de trabajo.
- c) El aire filtrado fluye a través del área de trabajo para asegurar un entorno protegido de contaminación de muestras, cultivos, medios y otros materiales.
- d) La turbulencia generada por objetos en movimiento (ej: manos del operador) en el interior de la cabina puede comprometer el flujo de aire y resultar en la liberación de partículas infecciosas dentro de la cabina.
- e) El aire que atravesó el área de trabajo se filtra nuevamente y vuelve a la habitación o es ventilado hacia el exterior.

## 3-Las luces UV no son esenciales para las cabinas de bioseguridad.

## 4- Ventana frontal

- a) La ventana en el frente de la cabina puede ser de vidrio o plástica, fija o corrediza.
- b) Permite el acceso de las manos y materiales para su procesamiento.
- c) El tamaño de la abertura frontal controla la entrada del flujo de aire y esto afecta la velocidad del mismo a través del espacio de entrada.
- d) Para el funcionamiento apropiado de la cabina, la ventana corrediza debe mantenerse abierta a la altura recomendada por el fabricante (generalmente 20 cm).
- e) Muchas cabinas con ventanas verticales ajustables tienen una alarma que suena si la ventana no cumple con las condiciones de apertura.

**5-Manómetros (opcionales):** miden la presión diferencial a través de los filtros HEPA, pueden medir succión o presión dependiendo del modelo de cabina. En aquellos que miden presión, las lecturas muy altas podrían indicar una pérdida o rotura en el filtro HEPA y lecturas bajas indican que el filtro está tapado.

## D-Utilidad en el laboratorio de Microbiología

1. Para contener los aerosoles generados durante el procesamiento de las muestras o cultivos. Ejemplos: macerado de tejidos, preparación de extendidos y preparaciones en fresco, plaqueo de muestras, descontaminación de las muestras para cultivo de micobacterias, etc.
2. Para proteger muestras o materiales de la contaminación externa
  - Procesamiento de muestras obtenidas de sitios estériles.
  - Procedimientos de cultivo celular.
  - Preparación de medios o reactivos en forma aséptica.

## E-Limitaciones

1. Las cabinas de bioseguridad sólo protegen cuando están instaladas correctamente y se usan de acuerdo a las recomendaciones.
2. Los filtros HEPA no remueven del aire vapores tóxicos, inflamables o radioactivos.
3. El laboratorio es responsable del entrenamiento del personal en el uso apropiado de las cabinas.

## II. PRECAUCIONES

### Precauciones especiales:

- No obstruya el flujo de aire cubriendo la ventilación o la ventana frontal con otros equipos o materiales.
- Realice todos los procesos dentro del área de trabajo de la cabina, sin obstruir la entrada.
- Mueva los brazos lentamente dentro y fuera de la cabina. El equipo usado dentro de la cabina no debería producir corrientes de aire que interfieran con el flujo de aire.
- Pueden colocarse pequeñas tiras de un material liviano en la ventana para monitorear la dirección del flujo de aire en el frente.
- Se recomienda el uso de guantes.
- Para prolongar la vida útil del filtro HEPA, es conveniente apagar la cabina cuando no se está utilizando.
- Las luces U. V no deben estar encendidas cuando se está usando la cabina.

### ⇒ Ventilación y recirculación del flujo de aire:

- El sitio de descarga debería estar sobre el techo y alejado de los sitios de entrada al edificio.
- Los sistemas de conductos específicos para la descarga de la cabina son óptimos pero no obligatorios.
- Las cabinas que descargan el aire en el laboratorio (Clase II-A) y las cabinas que recirculan cantidades significativas de aire de la cabina (Clases II-B1 y II-B3) no deberían usarse con materiales volátiles tales como éter, acetona o grandes cantidades de alcohol.

⇒ **Requerimientos de Espacio:** idealmente, una cabina de seguridad debería estar en una habitación separada. Deje un espacio entre la cabina y la pared. Mientras se está usando la cabina, la puerta y ventanas de la habitación deben permanecer cerradas. Ubique la cabina lejos de las zonas de alto tránsito y corrientes de aire que podrían alterar el flujo de aire (ej: apertura de heladeras, estufas, etc). Deben estar lejos de chimeneas.

⇒ **Mecheros e Incineradores:** Las fuentes de calor interfieren con el flujo de aire y el calor excesivo daña los filtros HEPA.

- Use un dispositivo que genere calor mínimo. Si se debe usar flama, se puede usar un pequeño mechero con llama piloto.

- Siempre mantener la cabina encendida cuando se usa el mechero o incinerador. El calor producido por el dispositivo en ausencia de actividad del gabinete puede dañar los filtros HEPA.
- Para minimizar el efecto de turbulencia en el flujo de aire, coloque los mecheros e incineradores lejos del fondo de la cabina sin obstruir la ventilación.
- No debería usarse mecheros junto a materiales inflamables y sólo deberían usarse pequeñas cantidades de materiales inflamables.
- Ubique las líneas de vacío y gas de tal forma que sean de fácil acceso para el operador y se reduzcan los movimientos dentro de la cabina, que pueden alterar el flujo de aire.
- Si es posible coloque descartadores de material utilizado y todos los equipos necesarios para el trabajo, dentro de la cabina.
- Aquellos materiales que son muy grandes para ubicar dentro de la cabina deben ubicarse lo más próximos posible a la misma.

### III. MATERIALES

Reactivos para limpieza de la cabina: se pueden usar varios tipos de desinfectantes .

1. Compuestos fenólicos (disponibles comercialmente)
2. Hipoclorito 0.5%: Diluya blanqueadores domésticos con agua 1:10 a 1:100 como máximo. Después de la limpieza enjuague bien las superficies de metal para evitar corrosión.
3. Etanol 70 %: En cabinas que recirculan el aire, utilice volúmenes mínimos de alcohol.

### IV. Instalación y Certificación

- A. Cada cabina de bioseguridad debe ser revisada y certificada después de su instalación en el laboratorio, ya que su funcionamiento puede variar de acuerdo a las condiciones del laboratorio en el que se va a utilizar.
- B. Es conveniente decontaminar la cabina antes de desplazarla largas distancias.
- C. Cada vez que se cambian o reparan los filtros HEPA, se debería recertificar la cabina.
- D. La recertificación debería realizarse al menos una vez al año.

### V. CONTROL DE CALIDAD.

#### A. Diariamente:

- Desinfección: limpie con desinfectante todas las superficies de la cabina. Este procedimiento debe realizarse mientras la cabina está funcionando antes de comenzar a trabajar.
- Registre la lectura del manómetro.

#### B. Semanalmente:

- Limpie las luces U. V con alcohol 70%

### C. Mensualmente:

- Mida el rendimiento de la lámpara U. V.
- Controlar el rendimiento de la cabina mediante la exposición de placas de agar al aire durante 1 hora. Incubar las placas 24-48 hs a 35° C. Las placas no deben presentar colonias. Si se encuentran colonias debe repetirse el procedimiento para asegurar que se deben a falta de rendimiento de la cabina. Si se confirma recurrir al service.

**NOTA:** Para cabinas con circulación de aire estéril se aconseja controlar periódicamente su rendimiento colocando placas con medio de cultivo en el interior de la cabina. Exponga las placas **una hora** con el equipo en funcionamiento. Incubar dichas placas a 35° C durante 24 a 48 hs. **Las placas no deben contener colonias.** En caso observar desarrollo repetir el procedimiento para descartar contaminación previa del medio cultivo. Recorra al service especializado en caso de confirmarse los resultados.

### VI. Uso de Rutina.

1. Las cabinas de bioseguridad en laboratorios que trabajan 24 hs, pueden apagarse sólo para el mantenimiento diario.
2. Otros laboratorios pueden apagar sus cabinas cuando no las están usando o cuando se cierra el laboratorio.
3. Operación:
  - Encienda la cabina.
  - Suba la ventana hasta el nivel apropiado.
  - Apague las luces U. V. (si estuvieran prendidas).
  - Encienda las luces fluorescentes.
  - Una vez que la cabina estuvo encendida por 10 min. Revise el manómetro. No use la cabina si la lectura aumenta o cae repentinamente
  - Limpie la superficie de trabajo con desinfectante.
  - Coloque los materiales en la cabina separando el material limpio del contaminado.
  - Después de haber colocado todos los materiales en la cabina, permita que el equipo funcione durante 10 minutos antes de comenzar a trabajar. De esta manera el flujo de aire eliminará los contaminantes introducidos durante el movimiento de los materiales dentro de la cabina.
  - Evite mover objetos dentro y fuera de la cabina mientras esté trabajando ya que esto puede alterar el flujo de aire y permitir la salida de agentes infecciosos. Si debe mover objetos, hágalo muy lentamente.
  - Permita que la cabina funcione 15-20 min. después que se terminó de trabajar de tal manera de eliminar los aerosoles generados.
  - Retire los materiales de la cabina. El material infeccioso debe colocarse en un contenedor cerrado antes de retirarlo.
  - Desinfecte todos los materiales que podrían haberse contaminados antes de retirarlos de la cabina.

- Limpie las superficies de la cabina con un desinfectante.
- Apague el equipo y las luces fluorescentes. Encienda las luces UV y baje la ventana.

#### 4. Limpieza de pequeños derrames de materiales.

Las pequeñas salpicaduras de material potencialmente contaminado deben manejarse en forma similar a las que se producen en cualquier otro área del laboratorio

- No es necesario apagar el equipo. La cabina está diseñada para prevenir el escape de materiales infecciosos al medio ambiente. Coloque desinfectante sobre el material derramado, cúbralo con papel absorbente durante 20 min. (Esto permite que el desinfectante actúe y el flujo de aire remueva los aerosoles generados). Retire el papel absorbente y descártelo como residuo biológico.

### Selección de una cabina de Bioseguridad.

**Las cabinas de clase II son apropiadas para la mayoría de los laboratorios. En general las de clase IIA son suficientes para la mayoría de los propósitos.**

**Algunos de los factores a tener en cuenta cuando se elige una cabina son:**

- **Uso pretendido:** Para trabajar con pequeñas cantidades de materiales volátiles o materiales de olor fuerte, debería elegirse una cabina que ventile hacia afuera. Las cabinas de clase I no son adecuados para trabajar con cultivos celulares
- **Tamaño y espacio requeridos:** Debe considerarse que equipos deben estar en el gabinete o cerca de éste para realizar el trabajo necesario dentro del mismo y cómo afecta el movimiento en el laboratorio a su correcto funcionamiento.
- **Clase de Gabinete:** los laboratorios de microbiología clínica generalmente requieren al menos una cabina clase I y preferiblemente clase II. Solo aquellos laboratorios que trabajan con agentes altamente peligrosos requieren cabinas clase III (ej: virus).
- **Ruido:** debe considerarse que algunas cabinas deben funcionar durante todo el día y el ruido que generan, sobre todo en cuartos cerrados, puede perturbar al personal del laboratorio.

## HELADERAS Y CONGELADORES (FREEZERS)

### A) ESPECIFICACIONES AMBIENTALES

#### Ventilación

- a). Colocar las heladeras y congeladores (freezers) en ambientes con buena ventilación y áreas despejadas.
- b). Para permitir una adecuada circulación de aire; dejar entre 5 y 10 cm de separación entre la unidad y el techo y/o las paredes.
- c). Ubicar las unidades lejos de salidas de aire caliente y de luz solar; preferentemente en habitaciones donde la temperatura se mantenga entre 20 y 28°C.

## **Estabilidad**

Es muy importante que las unidades estén colocadas de manera que queden perfectamente niveladas respecto al piso. Esto puede controlarse con un nivel de burbuja; en caso de no tener uno disponible, se puede verificar que la unidad esta nivelada con las puertas. Si la unidad esta nivelada la puerta permanecerá abierta y sin balancearse hasta que sea cerrada manualmente.

## **Requerimientos eléctricos**

- a) - Asegurarse de que el voltaje sea el correcto de acuerdo al tipo de unidad.
- b). Seria ideal que cada unidad estuviese alimentada por un circuito propio. Si esto no es posible asegurarse de que las líneas estén en buenas condiciones.
- c).- Siempre que sea posible conectar las unidades a generadores de emergencia.

## **B) PRECAUCIONES ESPECIALES**

- 1- Nunca almacene comida o bebidas en las unidades de laboratorio.
- 2- No utilice congeladores (freezers) con descongelado automático para el laboratorio; las fluctuaciones causadas por los ciclos de congelación-descongelación, pueden provocar el deterioro de reactivos, cepas y otros materiales.
- 3- Asegurarse de que el piso alrededor de las unidades este siempre bien seco.
- 4- Si se almacena material de alto riesgo, es conveniente poner carteles indicando el tipo de material y las precauciones a considerar. Para almacenar sustancias muy volátiles o inflamables, se recomienda utilizar recipientes adecuados y con poca cantidad de material.
- 5- Para evitar deshidratación, se recomienda envolver los materiales en plástico o colocarlos en recipientes herméticos.
- 6- Evitar el almacenado de sustancias a elevadas temperaturas que hagan que el sensor de temperatura del aire supere el rango definido de fábrica, así se evita recargar el compresor.

## **C) CALIBRACION INICIAL**

- 1- Calibrar varios termómetros frente a un termómetro de referencia (ver Procedimiento de Calibración de Termómetros).
- 2- Colocar los termómetros en lugares de fácil acceso y visibles; debe haber al menos un termómetro en cada heladera o congelador (freezer). Antes de poner en funcionamiento una unidad nueva, colocar varios termómetros en distintas áreas, cerrar la puerta, dejar que la temperatura se equilibre al menos por una hora, y luego verificar las temperaturas de los mismos.
- 3- Para poner en funcionamiento una unidad, ajustar la temperatura adecuada con el regulador interno de la misma (6°C, -20°C, -70°C, etc. para heladera, congelador (freezer) y ultra congelador (freezer) (respectivamente); luego de que se detiene el compresor, dejar que se equilibre la temperatura durante una hora aproximadamente. Inmediatamente después, controlar los termómetros internos. Si se observan variaciones mayores a los 4°C, comunicarlo al fabricante. Es muy importante controlar la temperatura durante uno o dos días antes de colocar los materiales en la heladera o congelador (freezer).

## D) CALIBRACION DE RUTINA

### 1-Diariamente

- a. Cuando la unidad es abierta, al comenzar el día, verificar la temperatura y anotarla en la planilla de control; en el caso de haber más de un termómetro, deben anotarse todos los datos.

Las tolerancias sugeridas son:

- heladeras: 4 a 8°C
- congeladoras (freezers): -20 y -40°C, +/-5°C
- ultracongeladoras (freezers): -60°C y menos, +/-10°C

- b. Para las heladeras comprobar que el ventilador de circulación esté funcionando.
- c. - Para las congeladoras (freezers) es muy importante controlar la formación de hielo en los burletes de las puertas, que no permite un cerrado hermético, con la consecuente pérdida gradual de temperatura.

### 2-Semanalmente o cuando sea necesario

- a. Descongelar los congeladores (freezers), como mínimo cuando se acumuló hielo de ~1cm de espesor. Para esto, desenchufar, colocar varias toallas alrededor de la base, abrir la puerta y dejar que la unidad alcance temperatura ambiente; con mucho cuidado remover el hielo acumulado con una espátula o similar. Una vez limpio, enchufar y esperar al menos una hora antes de colocar los materiales nuevamente.

## PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN DE TERMÓMETROS

### Marcar cada termómetro:

1. Crear una hoja de calibración logarítmica
2. Grabe un número sobre el dorso de cada termómetro utilizando un marcador de punta de diamante.

### Método de Calibración:

1. Coloque el termómetro de referencia y los termómetros a calibrar en un baño de hielo.
2. Cuando el termómetro de referencia de una lectura de 0 °C, tome la lectura de los otros termómetros que se están calibrando y registre sus temperaturas en la hoja de registro logarítmica.
3. Repita los pasos 1 y 2 a todas las temperaturas que utilicen en el laboratorio, tales como 37 °C y 56°C.

### Cálculo del Factor de Corrección

- 1- Corregir la diferencia de las lecturas entre el termómetro de referencia (temperatura de referencia) y la de los otros termómetros que se están calibrando, sustrayendo la lectura mayor de la menor. Si la lectura del termómetro que se está calibrando es menor que la del termómetro de referencia, asigne un signo " +" al resultado de la sustracción. Este valor debe de ser agregado a la lectura del termómetro para igualar las lecturas que habrán de tomarse del termómetro de referencia. Inversamente, si la lectura del termómetro que se está calibrando es mayor que la del termómetro de referencia, asigne un

valor " –" al resultado. Este valor debe entonces ser sustraído de la lectura del termómetro para igualar al valor de referencia.

- 2- Corregir la diferencia entre la lectura del termómetro de referencia y la temperatura "real", utilizando el proceso antes descrito. Agregue el factor de corrección del termómetro de referencia al factor de corrección calculado en el paso 1 a cada termómetro siendo calibrado.
- 3- Determine el factor de corrección en cada una de las temperaturas para cada termómetro, y registre esta en una hoja logarítmica para el termómetro. La hoja logarítmica debe conservarse durante toda la vida del termómetro.
- 4- Los límites de tolerancia son establecidos por cada laboratorio, pero se acepta por lo común 1°C. Deseche todos los termómetros que excedan los límites de tolerancia.

En la tabla inferior se pueden ver algunos ejemplos del factor de corrección.

Temperatura "Real"	Temperatura de Referencia	Factor de Corrección
0°	+0.1°	- 0.1
37°	36.9°	+ 0.1
56°	55.9°	+ 0.1

## ESTUFAS

### Estufas de aire (GAS)

- a. Los termómetros e higrómetros internos, deben ser colocados lejos de las puertas de la unidad.
- b. Cierre la puerta de la estufa, y asegúrese de que permanezca de esta forma durante toda la calibración.
- c. Si la unidad posee termostato de seguridad, enciéndalo junto con el regulador de temperatura, llevando ambos al máximo permitido. Controle la temperatura.
- d. Cuando la estufa llegue a la temperatura de seguridad deseada (generalmente 2°C por sobre la temperatura de trabajo), baje lentamente el termostato de seguridad hasta que se encienda el piloto automático.
- e. Ajuste con el regulador de temperatura la temperatura óptima y deje a la estufa media hora aproximadamente para que se equilibre (generalmente la temperatura se ajusta a 37°C).
- f. Cuando la temperatura se ha estabilizado, bloquee de alguna forma el termostato de seguridad evitando que sea modificado accidentalmente.
- g. Para calibrar el termómetro interno, espere 10 min con la puerta cerrada y luego compare la temperatura con la de un termómetro de referencia ubicado sobre uno de los estantes en el centro de la estufa. Si se observan discrepancias corregir la escala del termómetro de trabajo. Se recomienda controlar la temperatura de otras áreas de la incubadora ubicando el termómetro de referencia en distintas posiciones de la misma (al frente, al fondo arriba, al fondo en las esquinas de la parte inferior, etc.) para conocer de esta manera los lugares más fríos y más calientes, y no utilizarlos para el cultivo de gérmenes muy sensibles.

- h. Para regular la humedad, coloque un higrómetro en el estante central de la estufa. Lea el valor de humedad luego de 1 hora. Si la lectura es menor de 40%, coloque una bandeja con agua (si es posible también con antifúngicos) en alguno de los estantes de la estufa.
- i. Deje a la estufa funcionando durante toda la noche y controle todo nuevamente, antes de colocar los materiales a incubar.

## **Estufas de CO<sub>2</sub>**

- a. Instale de la misma forma que las estufas de aire.
- b. Verifique la presión de los tanques antes de conectarlos a la entrada de inyección de la estufa (el valor de la presión debe ser el recomendado por el fabricante).
- c. Controle todas las conexiones y salidas de gas con un detector. Se recomienda utilizar cinta de teflón para sellar las conexiones.
- d. Gire el control de la válvula hasta que el indicador señale el valor de presión sugerido por el fabricante (generalmente es de 0.5 litros/ min)
- e. Controle la presión luego de que la puerta se mantuvo cerrada por varias horas. Si el nivel no se acerca al 5%, ajuste la válvula control.
- f. Ajuste el cronómetro (*timer*) de inyección de CO<sub>2</sub>, (incrementa la inyección para restablecer el nivel al abrir la puerta).
- g. Espere 1 min y verifique que el nivel de CO<sub>2</sub> sea el deseado. Si el nivel no se acerca al 5%, reajuste el cronómetro ("timer") para un intervalo de inyección mas corto o más largo, según sea necesario.

## **CONTROL DE CALIDAD DE RUTINA**

### **- Diariamente**

- 1-Leer y registrar la temperatura en una planilla.
- 2-Controlar los niveles de CO<sub>2</sub> y registrarlos.

### **- Cada 3 días**

- 1-Estufas de 35°C : cultivar *N. gonorrhoeae*, y verificar su crecimiento.
- 2-Estufas de 42°C : cultivar *Campylobacter jejuni*, y verificar su crecimiento.

### **- Semanalmente**

- 1-Leer y registrar la humedad.
- 2-Rellenar y/o recambiar el agua del humidificador según sea necesario.
- 3-Controlar los niveles de CO<sub>2</sub> y registrarlos.

### **- Mensualmente**

- 1-Verificar el nivel de CO<sub>2</sub>

### **- Al menos una vez al año**

- 1-Limpiar la estufa por dentro y por fuera.
- 2-Controlar las tuberías por posibles pérdidas.
- 3-Verificar que los estantes no estén desnivelados.
- 4-Controlar los burletes de las puertas para asegurarse un cerrado hermético.

## PROCEDIMIENTOS ESPECIALES

### Limpieza por contaminación con moho

- a. Preparar una solución blanqueadora (lavandina al 10%) y limpiar todos los estantes y superficies, dejándolas lo más húmedo posible. (Es muy importante que la limpieza se realice utilizando guantes de goma).
- b. Dejar las superficies húmedas por 5 o 10 min y luego secarlas.
- c. Es muy importante lavar y enjuagar bien todos los estantes para retirar los posibles residuos de la solución de limpieza, ya que podría corroer el metal de la estufa.
- d. Dejar la puerta abierta hasta que los vapores de la solución limpiadora desaparezcan, antes de reubicar los cultivos.

### Inconvenientes habituales

- a. Si la temperatura tiene variaciones por encima o por debajo del valor estipulado, verificar la conexión eléctrica.
- b. Si la temperatura fue ajustada más de dos veces y todavía no se obtuvo un rango aceptable de temperatura, llamar al representante técnico.
- c. Si los niveles de CO<sub>2</sub> no se mantienen, o se encuentran sobre o por debajo del nivel normal, verificar que los tanques estén llenos, controlar las líneas, y las tuberías por posibles pérdidas.
- d. Si los niveles de humedad están por debajo de lo normal, rellenar el contenedor con agua.
- e. Si los niveles de humedad son muy altos, pueden causar condensación. Si esto ocurre, retirar el contenedor de agua, algunas estufas quedan selladas de manera que retienen suficiente humedad por sí solas. Otra posibilidad es reducir la cantidad de agua hasta llegar a un valor de humedad del 40%





FORMULARIO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LAS HELADERAS Y CONGELADORES (FREEZERS)

Instrumento: \_\_\_\_\_  
 Modelo No.: \_\_\_\_\_  
 Serie No.: \_\_\_\_\_  
 Fecha de Compra: \_\_\_\_\_  
 Fabricante: \_\_\_\_\_

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Enero																															
Febrero																															
Marzo																															
Abril																															
Mayo																															
Junio																															
Julio																															
Agosto																															
Septiembre																															
Octubre																															
Noviembre																															
Diciembre																															

\*Diariamente o en cada uso.





**FORMULARIO DE REGISTRO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE ESTUFAS DE CULTIVO**

Laboratorio: \_\_\_\_\_ Mes: \_\_\_\_\_ Año: \_\_\_\_\_

Fecha	Estufa de CO <sub>2</sub>			Est. Aire Temp	Est 42° Temp	Est 30° Temp	Otras Est Temp	Otras Est Temp	Iniciales del Operador
	Temp	%CO <sub>2</sub>	% Hum						
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									
14									
15									
16									
17									
18									
19									
20									
21									
22									
23									
24									
25									
26									
27									
28									
29									
30									
31									
Acciones: Correctivas									

Temp = temperatura; Hum = humedad;





## Equipos, Mediciones y Controles

Equipo	Procedimiento	Período	Límites de Tolerancia	Precauciones
Refrigerador	Registrar temperatura	Diario	$x \pm 1^{\circ}\text{C}$	Limpieza mensual. Descongelar cada 6 meses
Congelador	Registrar temperatura	Diario	$x \pm 1^{\circ}\text{C}$	Limpiar y descongelar cada 6 meses
Incubadora	Registrar temperatura	Diario	35 a 37 °C	Limpieza mensual
Incubadora de CO <sub>2</sub>	Registrar temperatura y concentración de CO <sub>2</sub>	Diario	35 a 37°C 5 a 10%	Limpieza mensual
Baño María	Registrar temperatura	Diario	37 a 38°C	Limpieza mensual
Placa de calentamiento	Registrar temperatura	Diario	$x \pm 1^{\circ}\text{C}$	Limpiar cada vez que se use
pH (Medidor)	Solución calibradora	Cada vez que se use	$x \pm 0.1^{\circ}\text{C}$	Limpiar cada vez que se use
Autoclave	Esporas de <i>B. stearot</i>	Semanal	No crecimiento	Limpieza mensual y agregar agua
Microscopio	Limpieza correcta	Cada vez que se use		Mantenimiento general cada 6 meses
Jarra de anaeróbios	Tira de Azul de Metileno	Cada vez que se use	De azul a blanco	Reactivo catalizador después de usarse y cambio cada 3 meses
Centrífuga	Comprobar r.p.m.	Mensual	$X \pm x0.05$	Inspección general y mantenimiento cada 6 meses
Campana de seguridad	Flujo de aire y luz UV	Cada 6 meses	45 a 55 pies/min	Limpieza diaria, inspección general y mantenimiento anual
Medio ambiente	Registro de temperatura	Diario	22 a 30°C	Inspección general anual
Humedad	Registro	Diario	30 a 60%	Evitar aparatos que la modifiquen

### **Bibliografía:**

- 1- Castillo de Sánchez ML, Fonseca Yerena ME, ed. Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina. Bogotá, Editorial Médica Panamericana.,1995.
- 2- Hindler JA, Jorgensen JH. Procedures in Antimicrobial Susceptibility Testing In Mahon CR, Manuselis, Jr. G, ed. Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, W.B. Saunders Co.,1995:58-96
- 3- Métodos para Evaluar la Efectividad Antimicrobiana. En Finegold SM, Baron EJ, ed. Bailey Scott Diagnóstico Microbiológico. Bogotá, Editorial Médica Panamericana.,1989: 190-210
- 4- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests-Sixth Edition; Approved Standard. NCCLS document M2-A6 (ISBN 1-56238-308-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898. Vol. 17 No. 1.
- 5- Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos En Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM, ed. Diagnóstico Microbiológico. Bogotá, Editorial Médica Panamericana.,1985: 380-402
- 6- Rausch M. Quality Improvement in the Microbiology Laboratory In Mahon CR, Manuselis, Jr. G, ed. Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, W.B. Saunders Co.,1995:97-111
- 7- Schifman RB. Strategies for Quality Management in Clinical Microbiology. Lab Med 1995,15: 437-446