

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**ENSAYO PRELIMINAR DE LIOFILIZACIÓN DE CEPAS MICROBIANAS  
A SER UTILIZADAS EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**

**CLAUDIA ARLETH MENJÍVAR MÉNDEZ.**

**MARCELA YANIRA ORTÍZ PALMA.**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA**

**MAYO 2005**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA.**



**©2004, DERECHOS RESERVADOS**

**Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador**

**<http://virtual.ues.edu.sv/>**

**SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**Rectora**

**Dra. María Isabel Rodríguez.**

**Secretaria General**

**Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos.**

**FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**Decano**

**Lic. Salvador Castillo Arévalo.**

**Secretaria**

**MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar.**

## **COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN**

### **Coordinadora General**

**Licda. María Odette Rauda Acevedo.**

### **Asesoras de Área de Microbiología**

**MSc. Coralia Figueroa de Murillo.**

**MSc. Coralia González de Díaz.**

### **Docente Directora**

**MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A DIOS TODOPODEROSO, por permitirnos culminar nuestra carrera universitaria.

A NUESTRA ASESORA, MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos, por todos los valiosos aportes brindados a esta investigación, por su paciencia y disposición durante el proceso.

AI COMITÉ DE PROCESO DE GRADUACIÓN: Lic. Odette Rauda, MSc. Coralía de Murillo y MSc. Coralía de Díaz por orientarnos a través de sus evaluaciones a un mejor desarrollo de nuestro trabajo.

AL LABORATORIO CENTRAL Dr. MAX BLOCH: Lic. Sandra de Fuentes, por su apoyo, cooperación y tiempo prestado.

Al Señor Coreas, Amy Morán y Juan José Rivas, por su valiosa colaboración al desarrollo experimental de esta investigación.

Claudia y Marcela.

## DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO Y A LA VIRGEN MARIA, gracias por haberme otorgado la bendición de poder finalizar mi carrera, por estar presentes y manifestarse en cada momento de mi vida con su inmenso amor y por haber puesto en mi camino todas aquellas personas que me ayudaron a concluirla.

A MIS PADRES, Argentina y José, gracias por sus sabios consejos, esfuerzo incondicional, dedicación, amor y comprensión que siempre me han brindado.

A MIS HERMANOS, Iris y Daniel, por su ayuda, apoyo y amor brindado a lo largo de mi vida.

A MIS ABUELITOS, Angelita y Daniel, porque siempre me apoyaron a seguir adelante y dieron consejos valiosos durante mis años de estudio.

A MI COMPAÑERA DE TESIS, Marcela, por toda su ayuda para la realización de este trabajo y por brindarme su amistad durante los años de estudio.

A MIS AMIGOS, por su aliento, amistad sincera, compañía y consejos oportunos en cada momento compartido.

Claudia Arlet Menjívar Méndez.

## DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a:

DIOSITO, quién me regaló el don más preciado que es la vida y que me ha sostenido en la tormenta y en la calma, gracias a Él debo lo que soy.

A MIS PADRES AMADOS, Victoria y Francisco, que me dieron hasta su último sacrificio para formarme como una mujer de bien. Gracias por ser los pilares más importantes que mi vida ha tenido.

A MIS TIOS QUERIDOS, Ada y Frank, gracias por apoyarme y por estar conmigo en las buenas y en las malas, a ustedes les doy todo mi cariño y respeto.

A MI HERMANITA, Claudia, por estar conmigo apoyándome en mis buenas y malas decisiones, gracias por ser como eres.

A MI ESPOSO, José Carlos, que pese a todas las pruebas que hemos pasado seguimos juntos y tomados de la mano. Para tí todo mi amor.

A MI HIJITO QUERIDO, la personita más hermosa que Dios me ha regalado, y que es y será lo más importante de mi vida.

A MI NUEVA FAMILIA, Don Carlos, Doña Marina, Diana, Evelyn y Henry, les agradezco su apoyo y comprensión, a ustedes todo mi cariño y aprecio.

A MI COMPAÑERA DE TESIS, Claudia, a quien le agradezco por todo su apoyo y sobre todo, por ser la ayuda más grande en la culminación de este proyecto. Que Dios te bendiga siempre.

A MIS AMIGAS, Roxana, Claudia y Eva María, gracias por todos estos años de amistad y por ser un apoyo importante a mi vida.

Marcela Yanira Ortíz Palma.



3.1.7.2 Control de calidad de reactivos, tintes y agua	32
3.1.8 Monitoreo de cepas de referencia	33
3.1.8.1 Tipos de cepas	33
3.1.8.2 Métodos de conservación de cepas bacterianas	38
3.2 Liofilización	38
3.2.1 Factores que afectan la liofilización	39
3.2.2 Ventajas de la liofilización	40
3.3 Aseguramiento de la Calidad	41
CAPITULO IV	
4.0 Diseño Metodológico	45
4.1 Investigación Bibliográfica	45
4.2 Investigación de Campo	45
4.3 Parte Experimental	47
4.3.1 Recolección de cepas	48
4.3.2 Siembra de cepas	48
4.3.3 Examen macroscópico de cepas	49
4.3.4 Examen microscópico de cepas. (Tinción de Gram)	49
4.3.5 Pruebas bioquímicas	50
4.3.6 Liofilización	55
4.3.7 Control de calidad de cepas	57
4.3.8 Almacenamiento de cepas	57

CAPITULO V	
5.0 Resultados	59
CAPITULO VI	
6.0 Discusión de resultados	80
CAPITULO VII	
7.0 Conclusiones	83
CAPITULO VIII	
8.0 Recomendaciones	87
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo N° 1: Procedimiento para la realización de tinción de Gram.
- Anexo N° 2: Características morfológicas de las bacterias.
- Anexo N° 3: Entrevista acerca del Aseguramiento de la Calidad en cepas microbianas en un laboratorio de microbiología.
- Anexo N° 4: Listado de laboratorios entrevistados que cumplen con Aseguramiento de la Calidad.
- Anexo N° 5: Método para aislamiento de cultivo puro.
- Anexo N° 6: Escala de McFarland.
- Anexo N° 7: Términos usados para describir la morfología de colonias.

## ÍNDICE DE CUADROS

	Págs.
Cuadro N° 1. Listado de cepas ATCC y cepas salvajes utilizadas en el laboratorio de microbiología	35
Cuadro N° 2. Listado de cepas ATCC con sus aplicaciones	36
Cuadro N° 3. Listado de cepas ATCC y cepas salvajes donadas al laboratorio de CENSALUD	48
Cuadro N° 4. Detección de la fermentación de hidratos de carbono	49
Cuadro N° 5. Reacciones bioquímicas para bacterias gram negativas	50
Cuadro N° 6. Pruebas de identificación para bacterias gram positivas	52
Cuadro N° 7. Resultados de los parámetros de cómo los laboratorios en estudio realizan el Aseguramiento de la Calidad	61
Cuadro N° 8. Listado de cepas ATCC utilizadas en los laboratorios de microbiología en estudio	62
Cuadro N° 9. Resultados de la morfología macroscópica de cepas ATCC y cepas salvajes	65
Cuadro N° 10. Resultados de la morfología microscópica de cepas ATCC y cepas salvajes	68
Cuadro N° 11. Resultados de pruebas de identificación para bacterias gram positivas	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
Fig. N° 1. Diagrama de flujo de los pasos a seguir en la parte experimental	47
Fig. N° 2. Diagrama de flujo para la realización de la liofilización	56
Fig. N° 3. Resultado obtenido de los laboratorios sobre el conocimiento de Aseguramiento de la Calidad	59
Fig. N° 4. Resultado obtenido de cuántos de los laboratorios entrevistados tienen implementado el Aseguramiento de la Calidad	60
Fig. N° 5. Porcentaje de resultados de los laboratorios que brindaron información de cómo realizan el Aseguramiento de la Calidad	60
Fig. N° 6. Porcentaje de los laboratorios en estudio que utilizan cepas ATCC	62
Fig. N° 7. Morfología macroscópica de bacterias gram negativas	67
Fig. N° 8. Morfología macroscópica de bacterias gram positivas	67
Fig. N° 9. Morfología microscópica de bacterias gram negativas	69
Fig. N° 10. Morfología microscópica de bacterias gram positivas	69
Fig. N° 11. Prueba en agar Hierro-Triple-Azúcar (TSI)	71
Fig. N° 12. Producción de indol	71
Fig. N° 13. Reacción de rojo de metilo	72
Fig. N° 14. Reacción de voges proskauer	72
Fig. N° 15. Reacción de citrato de Simmons	73
Fig. N° 16. Prueba de motilidad	73
Fig. N° 17. Prueba de la catalasa	74
Fig. N° 18. Prueba de la coagulasa	75

Fig. N° 19.	Crecimiento en agar sangre de <i>Listeria monocytogenes</i>	75
Fig. N° 20.	Equipo de liofilización del laboratorio de CENSALUD	77
Fig. N° 21.	Balón que contiene al tubo con la muestra de cepas a liofilizar	77
Fig. N° 22.	Cepas liofilizadas en viales estériles	78
Fig. N° 23.	Almacenamiento de cepas liofilizadas en un desecador con sílica gel activada	78

## ÍNDICE DE TABLAS

	Págs.
Tabla N° 1. Resultado de pruebas de identificación para bacterias gram negativas	70
Tabla N° 2. Resultados del ensayo preliminar de liofilización de cepas microbianas	76

## ABREVIATURAS

AOAC: Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos.

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo.

CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

FDA: Administración de Drogas y Alimentos.

Fig.: Figura

ISO: Organización Internacional de Normalización

KOH: Hidróxido de potasio

MR-VP: Medio Rojo de metilo – Voges proskauer

SIM: Medio para detectar formación de sulfuro, producción de indol y motilidad.

TSA: Agar Tripticasa de soya.

TSI: Agar Hierro-Triple-Azúcar.

USP: Farmacopea de los Estados Unidos.

## RESUMEN

Un elemento vital para el Aseguramiento de la Calidad es el Control de la Calidad, dentro de éste se incluye un parámetro muy importante como es el monitoreo de cepas de referencia, utilizadas para desarrollar análisis microbiológicos con el fin de garantizar resultados confiables y precisos. Por tal razón, en ésta investigación se utilizó un método de conservación de cepas basado en la técnica de liofilización, que hoy en día es considerado como uno de los mejores métodos de conservación por mantener las cepas microbianas sin pérdida de viabilidad por muchos años. Para ello se recolectaron cepas salvajes y cepas de una colección americana de cultivos tipo, se procedió a determinar su pureza, luego se realizó pruebas bioquímicas para la identificación de sus características metabólicas y finalmente se realizó el ensayo de liofilización a cada una de las bacterias con lo que se demostró que las bacterias aún después de sufrir este proceso se encontraban viables. También en el presente trabajo se realizó un diagnóstico sobre la implementación del Aseguramiento de la Calidad en los laboratorios pertenecientes al país, de lo que se concluye que la mayoría de los laboratorios se encuentran en proceso de ello, ya que existen mayores exigencias en la realización de los análisis y en sus resultados para garantizar y demostrar que los métodos y medios empleados en todas las etapas de un análisis, estudio o investigación, se han realizado de acuerdo a la Norma ISO 9000 que es la base para estandarizar los Sistemas de Calidad de distintas empresas y en la que se asientan los sistemas de Aseguramiento de la Calidad.

**CAPITULO I.**  
**INTRODUCCIÓN**

## 1.0 INTRODUCCIÓN

En los últimos años han surgido en los distintos laboratorios microbiológicos un enorme interés en asegurar la calidad del trabajo que realizan, en el país existen laboratorios en proceso de acreditación y otros ya acreditados que se encargan de realizar análisis microbiológicos, los cuales deben garantizar resultados confiables basados en normas de calidad ya establecidas.

En el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) se encuentra el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico (LCCM), el cual se encarga de realizar diferentes análisis microbiológicos, dicho laboratorio debe implementar un cepario que será utilizado como parámetro de referencia para garantizar la calidad de las diferentes evaluaciones microbiológicas, con el fin de proporcionar credibilidad y confianza de la información generada y asegurar que las técnicas analíticas utilizadas sean adecuadas, seguras y reproducibles.

Por tal razón es necesario establecer condiciones de calidad que proporcionen el buen mantenimiento en una colección de cultivos microbianos para que en la realización de diferentes pruebas microbiológicas e investigaciones; dicha colección ofrezca datos confiables y comparables que proporcionen un grado aceptable de seguridad y de conformidad con los límites establecidos, debido a que en un laboratorio de microbiología los resultados son producto de interpretaciones y evaluaciones de diferentes reacciones bioquímicas.

A fin de desarrollar condiciones óptimas para la preservación de bacterias, un método de conservación eficaz y que asegura la viabilidad de las cepas por largo tiempo es la liofilización.

En el presente trabajo se recolectaron 12 cepas microbianas en diferentes hospitales de San Salvador, las cuales fueron inoculadas en diferentes medios de cultivo para posteriormente observar la morfología macro y microscópicamente para su respectiva identificación, se realizaron tinciones al gram que permitió separarlas en dos grandes familias, gram positivas y gram negativas, luego se procedió a realizar pruebas bioquímicas que dieron en definitiva la especie a la cual pertenece cada bacteria y finalmente se liofilizaron para mejor conservación y traslado.

La incorporación de un cepario de 12 bacterias soluciona problemas latentes que podrían incurrir en la salud de la población ya que por ser empleadas como control en una gran variedad de análisis, permite conocer el grado de confiabilidad de productos como alimentos, medicamentos y agua.

Es por ello que al realizar en la Universidad de El Salvador una investigación de esta índole, somos pioneros en la preservación de bacterias por el método de liofilización, contribuyendo así al correcto funcionamiento de un laboratorio de microbiología.

## **CAPITULO II.**

### **OBJETIVOS**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Realizar ensayo preliminar de Liofilización de cepas microbianas a ser utilizadas en un Laboratorio de Microbiología.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

2.2.1. Elaborar un diagnóstico en Laboratorios de Análisis Microbiológico que cumplan con Aseguramiento de la Calidad en cepas bacterianas.

2.2.2. Analizar macro y microscópicamente la morfología que presentan los diferentes microorganismos en estudio.

2.2.3. Desarrollar pruebas bioquímicas para identificar las características metabólicas que presentan estos microorganismos.

2.2.4. Utilizar un método de conservación de cepas basado en la técnica de Liofilización para un mejor mantenimiento de ellas.

2.2.5. Comparar las diferencias entre los microorganismos en estudio (cepas salvajes) con microorganismos de tipo American Type Culture Collection (ATCC).

2.2.6. Proponer bases del Aseguramiento de la Calidad en un Laboratorio de Microbiología.

**CAPITULO III.**  
**MARCO TEORICO**



### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1. CONTROL DE CALIDAD.

El Control de Calidad es un elemento vital en el laboratorio, ya que ayuda en la confiabilidad de las pruebas, su reproducibilidad, asegura la calidad de los materiales, reactivos y equipos empleados, mejora el autoconfianza del personal, detecta fallas que pueden reflejarse en el informe de resultados y en general provee un entorno de excelencia en todos los aspectos del trabajo. <sup>(18)</sup>

Según el Organismo Internacional ISO (Organización Internacional de Normalización), la Calidad se define como la totalidad de los rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas.

La Calidad se fundamenta en tres pilares:

- Diseño y planificación de actividades.
- Control de aquello que se ha diseñado y planificado con el fin de asegurar que se cumple adecuadamente.
- Comprobación que el diseño, la planificación y el control han sido correctos. <sup>(11)</sup>

Todos los laboratorios de microbiología deben establecer alguna forma de monitoreo continuo de la calidad del trabajo efectuado, estableciendo programas de mantenimiento tales como:

- Monitoreo de equipo de laboratorio.
- Personal de laboratorio.
- Monitoreo de instalaciones y condiciones ambientales.
- Métodos de ensayo y validación de métodos.

- Trazabilidad de la medición.
- Muestreo.
- Monitoreos de medios de cultivo, reactivos, tintes y agua.
- Monitoreo de cepas de referencia (mantenimiento del cepario). <sup>(18)</sup>

### **3.1.1. MONITOREO DE EQUIPO DE LABORATORIO**

El equipo debe ser operado por el personal autorizado, el cual deberá tener fácil acceso a las instrucciones sobre su uso y mantenimiento (cualquier manual proporcionado por el fabricante del equipo).

Un laboratorio de microbiología deberá disponer de procedimientos para el manejo seguro, transporte, almacenamiento, uso y mantenimiento del equipo a fin de asegurar el funcionamiento adecuado y prevenir la contaminación o deterioro.

Se debe mantener un registro de cada equipo y debe incluir lo siguiente:

- Nombre del fabricante, modelo, número de serie.
- Verificación que el equipo cumple los requisitos especificados.
- Las instrucciones del fabricante.
- Certificado de todas las calibraciones, así como la fecha de la próxima calibración.
- Plan de mantenimiento. <sup>(7)</sup>

Entre los controles de calidad efectuados a los equipos están: temperaturas de incubadoras, refrigeradores, baños de agua, calentadores y se determinan por medio de termómetros calibrados, medición del contenido de dióxido de carbono a incubadoras, calibración de pHmetros con soluciones buffer estándares y autoclaves por pruebas con tiras de esporas. <sup>(17)</sup>

### **3.1.2. PERSONAL DE LABORATORIO**

El personal es el factor más importante en la calidad del trabajo en el laboratorio de microbiología, ya que realiza tareas específicas y deberá estar calificado en cuanto a educación apropiada, capacitación, experiencia y aptitudes demostradas, según sea necesario. El laboratorio de microbiología debe autorizar personal específico para realizar tipos particulares de muestreo, ensayos y análisis para preparar informes e interpretaciones de los resultados y también para operar determinado tipo de equipos. El laboratorio debe mantener un registro de autorizaciones pertinentes, competencia, calificación académica y profesional, capacitación, destreza y experiencia de todo el personal contratado. <sup>(7)</sup>

### **3.1.3. MONITOREO DE INSTALACIONES Y CONDICIONES AMBIENTALES**

Las instalaciones del laboratorio de microbiología deben facilitar la correcta ejecución de los análisis y ensayos y deberá asegurar que las condiciones ambientales no invaliden los resultados o afecten negativamente la calidad requerida de cualquier análisis. Se deberá prestar la atención debida a la esterilidad biológica, polvo, trastornos electromagnéticos, radiación, humedad, materiales eléctricos, temperatura y niveles de sonido y vibración, según sea apropiado para las actividades a realizarse. Los análisis y ensayos deberán detenerse cuando las condiciones ambientales comprometan los resultados de las mismas. Los laboratorios de microbiología deberán de cumplir con los siguientes requisitos: ubicación conveniente, tamaño de acuerdo a la capacidad del laboratorio, diseño y construcción de acuerdo al tipo de operación destinada, iluminación y ventilación efectiva, locales limpios y ordenados de acuerdo a programas de limpieza,

separación efectiva entre áreas de actividad incompatibles para evitar la contaminación cruzada y tomar medidas necesarias para asegurar el buen mantenimiento del laboratorio. <sup>(7)</sup>

#### **3.1.4. MÉTODOS DE ENSAYO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS.**

El laboratorio de microbiología deberá usar métodos y procedimientos apropiados para realizar los análisis y ensayos dentro de su alcance. Se incluirá el muestreo, manejo, transporte, almacenamiento y preparación de los elementos que serán analizados, ensayados y calibrados, así como técnicas estadísticas para el análisis de los datos de ensayo y calibración.

El laboratorio deberá tener instrucciones para el uso y operación de todo el equipo relevante y para el manejo y preparación de los elementos de análisis. Todas las instrucciones, normas, manuales y datos de referencia indispensables para el trabajo del laboratorio deberán actualizarse y estar fácilmente disponibles para el personal.

La validación es la confirmación por análisis y la provisión de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto. La validación puede incluir procedimientos para el muestreo, manejo y transporte.

El laboratorio deberá validar los métodos no estandarizados, los métodos diseñados o desarrollados internamente, los métodos estandarizados usados fuera del alcance propuesto y las ampliaciones o modificaciones de métodos estandarizados para confirmar que estos se ajustan al uso propuesto. La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de la aplicación en cuestión. El laboratorio deberá registrar los resultados obtenidos, el procedimiento usado para la validación y una declaración acerca de que el método se ajusta al uso propuesto.

Las técnicas para determinar el funcionamiento de un método puede ser una o la combinación de las siguientes:

- Calibración con el uso de normas o materiales de referencia.
- Comparación de resultados obtenidos con otros métodos.
- Comparaciones entre laboratorios.
- Evaluación sistemática de los factores que influyen en los resultados.
- Evaluación de la incertidumbre de los resultados basados en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y la experiencia práctica.

Cuando se realizan algunos cambios en los métodos no estandarizados ya validados, se debe documentar la influencia de tales cambios y, si es apropiado, se debe efectuar una nueva validación.

La validación incluye la especificación de los requisitos, determinación de las características de los métodos, una verificación de que se puede cumplir los requisitos al usar dicho método y una declaración de su validez. (7)

### **3.1.5. TRAZABILIDAD DE LA MEDICIÓN.**

Todo equipo usado para análisis y ensayos en un laboratorio de microbiología que tenga un efecto significativo sobre la exactitud o validez del resultado del ensayo, muestreo o calibración, deberá calibrarse antes de ponerse en servicio. El laboratorio debe contar con un procedimiento y programa establecido para la calibración del equipo y los resultados obtenidos a partir de este equipo deben dar la mejor aproximación al valor verdadero cuya unidad de medición pueda ser relacionada con las unidades internacionales proporcionando la mayor exactitud posible en los análisis.

### **3.1.6. MUESTREO**

El muestreo es un procedimiento definido por el cual se toma parte de una sustancia, material o producto para realizar el ensayo de una muestra representativa del total. También puede requerirse del muestreo cuando lo indique la especificación por la cual la sustancia, material o producto tiene que ser analizada. En ciertos casos, la muestra puede no ser representativa pero se determina por su disponibilidad.

El laboratorio de microbiología debe contar con un plan de muestreo y procedimientos cuando realiza un muestreo para subsecuentes análisis y ensayos a fin de asegurar la validez de los resultados.

El plan y procedimientos para el muestreo deberán estar disponibles en el lugar donde se lleve a cabo el muestreo. También deberá establecer procedimientos de muestreo para el transporte, recepción, manejo, protección, almacenamiento y descarte, necesarios para proteger la integridad de la muestra.

El laboratorio debe establecer procedimientos para registrar los datos y las operaciones de muestreo, que formen parte del ensayo. Estos registros deberán incluir el procedimiento usado, la identificación del responsable de las muestras, condiciones ambientales y diagramas u otros medios equivalentes para identificar la ubicación del muestreo, así como también las estadísticas en las que se basan los procedimientos de muestreo. <sup>(7)</sup>

### **3.1.7. MONITOREOS DE MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, TINTES Y AGUA.**

#### **3.1.7.1. MEDIOS DE CULTIVO.**

**Definición:** Soporte que va a contener los nutrientes necesarios, así como unas condiciones óptimas de pH y humedad que permite el desarrollo y crecimiento de microorganismos. Pueden ser:

- Sólidos: Agar- Agar y gelatina.
- Líquidos o Caldos.

##### **3.1.7.1.1. CLASIFICACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.**

En función de su consistencia:

- Sólidos
- Líquidos
- Semisólidos

En función de su composición:

- Químicamente definidos
- Semisintéticos o complejos

En función del uso que se le dá:

- Enriquecidos
- De enriquecimiento
- Diferenciales
- Selectivos
- Transporte y mantenimiento <sup>(13)</sup>

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

- Los medios de cultivos deshidratados son higroscópicos y la absorción de agua del exterior, así como la formación de agua dentro del frasco favorecen el crecimiento bacteriano, éstos deben almacenarse siempre en lugares frescos, a temperatura ambiente y protegidos contra la humedad y la luz.
- Se debe mantener un registro de cada frasco de medio de cultivo deshidratado, con el nombre del producto, nombre y número telefónico de la casa proveedora, número de control del frasco, fecha de recibo, fecha de expiración, número de lote y fecha en que se abrió el frasco.
- El grado de disolución de un medio deshidratado depende en gran medida del procedimiento empleado en la rehidratación, se recomienda utilizar agua recién destilada o completamente desmineralizada y un erlenmeyer con capacidad del doble del medio que se quiere preparar.
- Cuando se va a esterilizar, debe asegurarse en seguir las instrucciones de tiempo, presión y temperatura para una obtención de medios de cultivo óptimos. Una temperatura de 121°C, presión de 15 libras y un tiempo de esterilización de 15 minutos, son suficientes para la mayoría de los medios.
- El medio esterilizado debe ser enfriado a una temperatura de 45-60°C en un baño María, para evitar el agua de condensación. Al ser vertidos en las placas Petri, evitar la formación de burbujas y coágulos.
- El medio de cultivo reconstituido tiene una vida útil limitada. Si no se emplea de inmediato, debe almacenarse a una temperatura de 4°C para garantizar su utilidad durante un período de tiempo.

- Los medios almacenados en refrigeración, cuando pasan a temperatura ambiente tienden a formar agua de condensación en la superficie, se recomienda poner las placas Petri en la incubadora a una temperatura de 35°C por 2 horas, colocándolos con el fondo hacia arriba para obtener una superficie seca.
- Cada lote preparado de medio de cultivo se prueba antes de su uso rutinario, por eficiencia o calidad mediante la inoculación de microorganismos, puede utilizarse para ello cepas bacterianas domésticas o cepas control comerciales (ATCC).
- Rotular todos los medios preparados, tanto en placas Petri como en tubos, indicando además, la fecha de preparación y expiración. <sup>(18)</sup>

#### **3.1.7.1.3. PRUEBAS BASICAS DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS PREPARADOS.**

- pH
- Esterilidad
- Capacidad de crecimiento y reacción
- Estabilidad

#### **3.1.7.1.4. CRITERIOS DE CALIDAD DE LOS MEDIOS PREPARADOS.**

- Rajadura de la placa o envase.
- Rajadura en la superficie del medio
- Variaciones en el volumen del medio
- Hemólisis
- Cristales en el medio
- Presencia de burbujas

- Presencia de coágulos
- Cambio de color normal
- Contaminación <sup>(18)</sup>

### **3.1.7.2. CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS, TINTES Y AGUA.**

Un elemento fundamental en el trabajo diario del laboratorio, lo constituyen los reactivos, tanto comerciales como de preparación doméstica, que son utilizados en la caracterización de microorganismos. Estos reactivos merecen una especial atención ya que fallas en su funcionamiento pueden generar identificaciones equivocadas.

Por ello, se recomienda correr controles diarios con las bacterias tipo y seguir estrictamente las indicaciones en cuanto almacenamiento de los reactivos, metodología de la prueba y tiempo de lectura.

El control de calidad de los tintes debe realizarse primero con cada nuevo lote preparado, luego basta con un control cada semana para mantener un grado de seguridad apropiado en su uso. En caso de la tinción de Gram, se recomienda tener especial cuidado con la mezcla de alcohol-acetona para decolorar la placa, ya sea por decoloración excesiva o por débil decoloración de los microorganismos, es también la etapa en la que el tiempo de exposición es más determinante. (Ver anexo N° 1)

El agua destilada en la preparación de medios de cultivos y para reconstituir reactivos, debe tener un control de calidad básico que incluye los parámetros químicos y bacterianos.

Control de calidad químico:

- pH
- Conductividad
- Olor
- Color aparente
- Turbidez
- Alcalinidad
- Dióxido de carbono
- Dureza

Control de Calidad Microbiológico; siembras en:

- Caldo tioglicolato
- Agar sangre.

### **3.1.8. MONITOREO DE CEPAS DE REFERENCIA**

A cada uno de los cultivos puros que componen una especie se denominan cepas. El cultivo puro es aquel que contiene una sola especie o tipo de microorganismo y que se ha obtenido a partir de una sola célula.

La mayoría de los procedimientos en microbiología, dependen de que los microorganismos viables en el cultivo sean típicos, reproducibles y capaces de mantener sus características fisiológicas y morfológicas. (Ver anexo N° 2).

Para ayudar en este control, las cepas estándar de control de calidad, son un componente esencial de un proceso de validación. <sup>(18)</sup>

### 3.1.8.1. TIPOS DE CEPAS.

- **Cepas de Referencia:** Microorganismos obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida. Se reconstituirán y someterán a los controles de pureza y ensayos bioquímicos que sean necesarios. Serán subcultivadas una sola vez para obtenerlas, de las que se obtendrán las cepas de trabajo.
- **Cepas de Reserva:** Cepas obtenidas a partir del cultivo de una cepa de referencia preparada y conservada por un laboratorio. Las cepas de reserva deben conservarse utilizando, una técnica que mantenga las características deseadas de las cepas de referencia, por ejemplo, liofilización.
- **Cepas de Trabajo:** Subcultivos de microorganismos obtenidos a partir de cepas de reserva para ser utilizadas en los ensayos que lo precisen. Se subcultivan en agar chocolate o agar sangre y se conservarán en refrigeración durante un período de tiempo que asegure la viabilidad del microorganismo, no más de un mes. <sup>(12)</sup>

Existen varias colecciones de cepas utilizables para el control de calidad, tal es el caso de American Type Culture Collection- Rockville, USA (ATCC), la colección más importante del mundo, éstas cepas bacterianas nos permiten conocer el grado de confiabilidad de los productos comerciales o elaborados en un laboratorio.

Las cepas de referencia deben tener requisitos específicos:

- Homogeneidad: Quiere decir que se trata de un cultivo puro.
- Valor de la Propiedad: Quiere decir que se trata de una cepa microbiana auténtica.
- Estabilidad: En microbiología quiere decir que las células microbianas puedan crecer. Por eso las colecciones suministran las cepas con las instrucciones para su recuperación.

- Exactitud y Trazabilidad: Los valores de los resultados analíticos deben dar la mejor aproximación al valor verdadero; de ahí que los métodos empleados serán aquellos que proporcionen la mayor exactitud posible.

La trazabilidad con las unidades fundamentales significa que la unidad de medida puede ser relacionada con las unidades internacionales y que los valores medidos se relacionan correctamente con aquella unidad. <sup>(11)</sup>

Cada cepa de una colección es única, lo cual quiere decir que los resultados de trabajos de microbiología realizados en diferentes laboratorios en distintos momentos, y utilizando cepas que tienen un mismo número en una colección, sólo son comparables entre sí, si los cultivos se obtuvieron de esa colección. Además, una misma cepa puede ser referencia para muchas cosas, sin haber perdido las características que le hacen adecuada para otros usos. <sup>(16)</sup>

Cuadro N° 1. Listado de cepas ATCC y cepas salvajes utilizadas en el laboratorio de microbiología.

<b>CEPAS ATCC</b>	<b>* CEPAS SALVAJES</b>
<b><i>Bacillus licheniformis</i></b> ATCC 12759	<b><i>Escherichia coli</i></b>
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 35150	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 35218	<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b>
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b> ATCC 27853	<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> ATCC 25923	<b><i>Salmonella sp</i></b>
<b><i>Salmonella typhi</i></b> ATCC 6539	<b><i>Salmonella typhi</i></b>

\*Cepas salvajes: son aquellas que han sido recolectadas de Instituciones Gubernamentales referente a la salud, y obtenidas a partir de pacientes portadores de estas bacterias.

Cuadro N° 2. Listado de cepas ATCC con sus aplicaciones. <sup>(9)</sup>

BACTERIA	MEDIO	APLICACIONES
<p><b><i>Staphylococcus aureus</i></b></p> <p>25923</p>	<p>Medio 18: Tripticasa Soya Agar.</p> <p>Temperatura: 37°C</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Control de calidad para API</li> <li>- Control de calidad de cepas</li> <li>- Pruebas preparatorias</li> <li>- Pruebas de susceptibilidad antimicrobianas</li> </ul>
<p><b><i>Escherichia coli</i></b></p> <p>35150</p>	<p>Medio 3: Agar Nutritivo o Caldo Nutritivo</p> <p>Temperatura: 37°C</p> <p>Condiciones de crecimiento: Aeróbicas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Control de calidad para API</li> <li>- Control de calidad de cepas</li> <li>- Ensayos de medios.</li> <li>- Pruebas preparatorias</li> <li>- Pruebas de susceptibilidad antimicrobianas</li> </ul>
<p><b><i>Escherichia coli</i></b></p> <p>35218</p>	<p>Medio 3: Agar Nutritivo o Caldo Nutritivo</p> <p>Temperatura: 37°C</p> <p>Condiciones de crecimiento: Aeróbicas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Control de calidad para API</li> <li>- Control de calidad de cepas</li> <li>- Pruebas para susceptibilidad</li> <li>- Ensayo para antibióticos lactámicos</li> </ul>

Cuadro N° 2. (Continuación)

BACTERIA	MEDIO	APLICACIONES
<p><b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b></p> <p>27853</p>	<p>Medio 3: Agar nutritivo o Caldo nutritivo</p> <p>Temperatura: 37°C</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Control de calidad para API</li> <li>- Control de calidad de cepas</li> <li>- Pruebas preparatorias</li> <li>- Pruebas de susceptibilidad antimicrobianas</li> </ul>
<p><b><i>Bacillus licheniformis</i></b></p> <p>12759</p>	<p>Medio 3: Agar Nutritivo o Caldo Nutritivo</p> <p>Temperatura: 30°C</p> <p>Condiciones de crecimiento: Aeróbicas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Control de calidad de cepas</li> </ul>
<p><b><i>Salmonella typhi</i></b></p> <p>6539</p>	<p>Medio 18 Tripticasa Soya Agar</p> <p>Temperatura: 37°C</p> <p>Condiciones de crecimiento: Aeróbicas</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prueba de limites microbianos</li> <li>- Pruebas para control de calidad en cepas y medios de cultivo.</li> </ul>

### 3.1.8.2. METODOS DE CONSERVACION DE CEPAS BACTERIANAS.

Los tres objetivos que hay que alcanzar para conservar correctamente las cepas microbianas en los laboratorios de microbiología son:

- Que el cultivo a conservar sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación.
- Que durante el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células.
- Que estas células permanezcan genéticamente estables. <sup>(17)</sup>

Algunos de los métodos de conservación más importantes son los siguientes:

- Resiembra periódica a medios frescos.
- Mantenimiento bajo capa de aceite.
- Congelación.
- Liofilización. <sup>(6)</sup>

## 3.2. LIOFILIZACION

Es el método más utilizado por las colecciones internacionales de cultivos tipo para la conservación de los microorganismos. Básicamente es un proceso que consiste en desecar un producto previamente congelado, en este caso, una suspensión de microorganismos y eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo sin pasar por el estado intermedio líquido. <sup>(14)</sup>

El proceso de liofilización está compuesto por tres etapas:

- Precongelamiento, la cual prepara el producto para el proceso de sublimación.
- Secado primario, en el cual el hielo se sublima sin derretirse.

- Secado secundario, en el cual la humedad residual ligada al material sólido es extraída, dejando un producto seco. Este paso es esencial para la estabilidad de la muestra. <sup>(15)</sup>

Esta técnica consiste en partir de un cultivo de fase estacionaria (donde las células son usualmente más resistentes) resuspendiendo las células en un medio crioprotector, en el cual se obtenga una alta densidad celular. Unas pocas gotas de suspensión celular son transferidas a una ampolla, la cual es congelada aproximadamente a  $-70^{\circ}\text{C}$  y deshidratada mediante una sublimación en vacío. Este debe ser mantenido en 5-10 $\mu\text{m}$  mediante una bomba.

El secado continúa hasta obtener un producto seco, poroso y esponjoso de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, hasta llegar a valores de humedad inferiores al 1%, luego la ampolla es sellada bajo vacío.

El medio protector empleado en la liofilización en el que se suspenden las bacterias, es un factor importante en el proceso, se utiliza para preservar aún mejor las bacterias a bajas temperaturas; entre los agentes recomendados están: la leche descremada en concentraciones del 10 al 20%; caldo inositol, suero equino, mezclas de sueros, glucosa y extracto de levadura; suero fetal bovino, etc.

Los liófilos se conservan a temperatura ambiente o también entre 0 y  $18^{\circ}\text{C}$  durante muchos años. Para su recuperación se resuspende el liófilo en el medio de cultivo adecuado y se incuban a la temperatura adecuada. <sup>(14)</sup>

### **3.2.1. FACTORES QUE AFECTAN LA LIOFILIZACION.**

Los factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

- Tipo de microorganismo. Hay algunos microorganismos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquellos que contengan más agua en su interior.
- Concentración celular. Lo mejor es liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de  $10^8 - 10^9$  células/ml en el caso de las bacterias y algo inferior en el caso de hongos filamentosos y levaduras.
- Temperatura durante la sublimación. Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de  $-50^{\circ}\text{C}$ .
- Grado de deshidratación alcanzado. Debe ser lo más alto posible, aunque la concentración de solutos puede conllevar una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.
- Atmósfera de oxígeno en el tubo. Las células liofilizadas se guardan en tubos cerrados al vacío para evitar, tanto la rehidratación como la presencia de algún gas dentro del tubo, como el oxígeno que puede dañar a las células.
- Condiciones de almacenamiento. La temperatura debe ser constante, a temperatura ambiente, o también a  $18^{\circ}\text{C}$  y sin bajar de los  $0^{\circ}\text{C}$ . Los liófilos se deben guardar en la oscuridad. <sup>(17)</sup>

### **3.2.2. VENTAJAS DE LA LIOFILIZACION.**

El secado convencional hace que el material se encoja o contraiga, dañando las células. Sin embargo, en el proceso de liofilización, los componentes sólidos son retenidos en su lugar por el hielo rígido. La sublimación del hielo deja vacíos, preservando así la integridad de las actividades y estructura biológica y química del producto. Debido a sus cualidades preservantes, la liofilización tiene muchos y variados usos en el laboratorio. Se ha convertido en un medio indispensable en

muchas aplicaciones químicas y farmacéuticas. Se usa para lograr la estabilidad en almacenamiento a largo plazo de los materiales biológicos tales como los cultivos microbianos, enzimas, sangre y productos farmacéuticos como vitaminas, vacunas y antibióticos. <sup>(15)</sup>

Entre las ventajas más importantes de la liofilización están:

- La mayoría de los microorganismos sobreviven al secado.
- El cultivo es fácilmente mantenido aun a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad.
- Gran longevidad.
- Menores oportunidades de cambio en las características del cultivo.
- Recipientes pequeños en donde se almacenan los cultivos.
- Se obtienen productos de reconstitución rápida y completa. <sup>(6)</sup>

### **3.3. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD.**

Para llevar a cabo lo anteriormente mencionado de Control de la Calidad en un laboratorio de microbiología se necesita de otro factor importante como es el Aseguramiento de la Calidad para garantizar que todos los procesos se están realizando dentro de ciertas normas.

Las normas ISO 9000 son un conjunto de normas que aportan las reglas básicas para desarrollar un Sistema de Calidad totalmente independientes del fin de la empresa o del producto o servicio que proporcione. Son aceptadas en todo el mundo como un lenguaje común que garantiza la calidad continua de todo aquello que una organización ofrece y son revisadas periódicamente por la Organización Internacional de Normalización (ISO) sobre el Aseguramiento de la Calidad de los procesos. En los

últimos años se está poniendo en evidencia que no basta con mejoras que se reduzcan, a través del concepto de Aseguramiento de la Calidad, al control de los procesos básicamente, sino que la concepción de la calidad sigue evolucionando, hasta llegar hoy en día a la llamada Gestión de la Calidad Total. Dentro de este marco, la Norma ISO 9000 es la base para estandarizar los Sistemas de Calidad de distintas empresas y en la que se asientan los sistemas de Aseguramiento de la Calidad.

El Aseguramiento de la Calidad es un programa llevado a cabo por un laboratorio con la finalidad de mejorar en conjunto su funcionamiento. <sup>(12)</sup> Es un concepto un tanto más difícil de cuantificar que el Control de Calidad, nos indica la confiabilidad del trabajo, esto incluye entrenamiento y calificación del personal, evaluación de los reportes, certificación de los laboratorios, controles externos, etc. El Aseguramiento de la Calidad incluye todas aquellas actividades planificadas y sistemáticas, equipos, materiales, procesos, documentación y personal requeridos para que las tareas y operaciones se desarrollen asegurando calidad en sus resultados, disminuyendo al mínimo los efectos de posibles fuentes de error. <sup>(18)</sup>

El Aseguramiento de la Calidad tiene la doble responsabilidad de comprobar los procedimientos y resultados, y de garantizar que el trabajo está siendo conducido apropiadamente. Se consigue así un alto grado de aseguramiento y que los números obtenidos puedan ser confiables. El Aseguramiento de la Calidad es la herramienta disponible más usada para asegurar que el reporte de resultados sea confiable.

En muchas ocasiones se confunde el Aseguramiento de Calidad con el Control de Calidad. El Control de Calidad consiste de una serie de ensayos, análisis o medidas que se realizan sobre el producto acabado para ver si cumple con la calidad especificada. Así mismo se engloba dentro del Control de Calidad todo aquello

destinado a verificar que la calidad de las materias primas es la correcta, según acuerdos o normas, y que las operaciones del proceso de fabricación van dando resultados correctos. En la elaboración de un producto, el control de calidad, comprende un programa de operaciones analíticas o de verificación.

El Aseguramiento de la Calidad es mucho más amplio. Podría definirse como “la creación y aplicación de un sistema que garantiza y demuestra que los métodos y medios empleados en todas las etapas de un análisis, estudio o investigación, se han realizado cumpliendo las Buenas Prácticas de Laboratorio”.

Se observa además que el Aseguramiento de la Calidad, dentro de una organización, asume funciones tales como:

- Planeamiento de la calidad (normas, procedimientos, instrucciones).
- Elaboración, revisión y control de manuales y programas de la calidad.
- Control de la documentación de la calidad.
- Evaluación de la efectiva implantación y eficacia del sistema de la calidad (auditorías y revisión por la dirección).
- Asegurar la provisión de productos y servicios de acuerdo con la calidad especificada.
- Control de no conformidad y acciones correctivas, internas y externas (en el ámbito de la empresa o generadas por reclamos o sugerencias de clientes).

Un laboratorio debe establecer, aplicar y mantener un Sistema de Aseguramiento de la Calidad apropiado al alcance de sus actividades. De igual forma debe documentar sus políticas, sistemas, programas, procedimientos e instrucciones en el nivel necesario para asegurar la calidad de los resultados. La documentación del sistema debe estar a disposición del personal apropiado para su correspondiente aplicación. <sup>(10)</sup>

**CAPITULO IV.**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1. Investigación Bibliográfica:

4.1.1. Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

4.1.2. Laboratorio Central Dr. Max Bloch.

4.1.3. Laboratorio Especializado en Control de Calidad (LECC).

4.1.4. Internet.

### 4.2. Investigación de Campo:

Tipo de estudio: Experimental y transversal.

Universo: 77 Laboratorios inscritos en la Junta de Vigilancia de la Profesión Química Farmacéutica.

Muestra: Los puntos de muestreo se escogieron aleatoriamente para asegurar la representatividad de las muestras, la cantidad de las mismas se estableció de acuerdo a la siguiente fórmula para determinar el tamaño de la muestra conociendo la población: <sup>(1)</sup>

$$n = \frac{Z^2 PQN}{(N-1) E^2 + Z^2 PQ}$$

Donde los valores que aparecen en la fórmula se obtuvieron de la siguiente forma:

E= error muestral máximo permisible en la investigación, por lo tanto, E= 0.3 por ciento.

P= proporción poblacional de la ocurrencia de algo, por lo tanto, P= 0.5; Q= 1-P,

Q=0.5

Z= valor crítico correspondiente a un determinado grado de confianza, para el caso del 95 por ciento, el valor de Z será 1.96

N= Tamaño de la población, por lo tanto, N= 77

Sustituyendo en la fórmula:

$$n = \frac{Z^2 PQN}{(N - 1) E^2 + Z^2 PQ} = \frac{(1.96)^2 (0.5) (0.5) (77)}{(76) (0.3)^2 + (1.96)^2 (0.5) (0.5)}$$

$$n = 9.48; \quad n = 9.5$$

Aproximando,  $n = 10$ , es el tamaño de la muestra, en este caso 10 laboratorios.

Para realizar esta etapa de la investigación, el instrumento utilizado para evaluar la situación en los diferentes laboratorios de microbiología que realizan análisis de alimentos, medicamentos y agua, que cumplan con el Aseguramiento de la Calidad en cepas bacterianas fue una guía de entrevista. (Ver anexo N° 3)

Por medio de la Junta de Vigilancia de la Profesión Química Farmacéutica (JVPQF) se obtuvo un listado que contiene el nombre, dirección y número telefónico de todos los laboratorios pertenecientes al país; posteriormente se investigó cuales poseen laboratorios de microbiología que tengan implementado el Aseguramiento de la Calidad, por lo que se procedió a entrevistar 10 laboratorios. (Ver anexo N° 4)

#### 4.3. Parte Experimental:

El proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico en CENSALUD y se realizó de la siguiente forma:

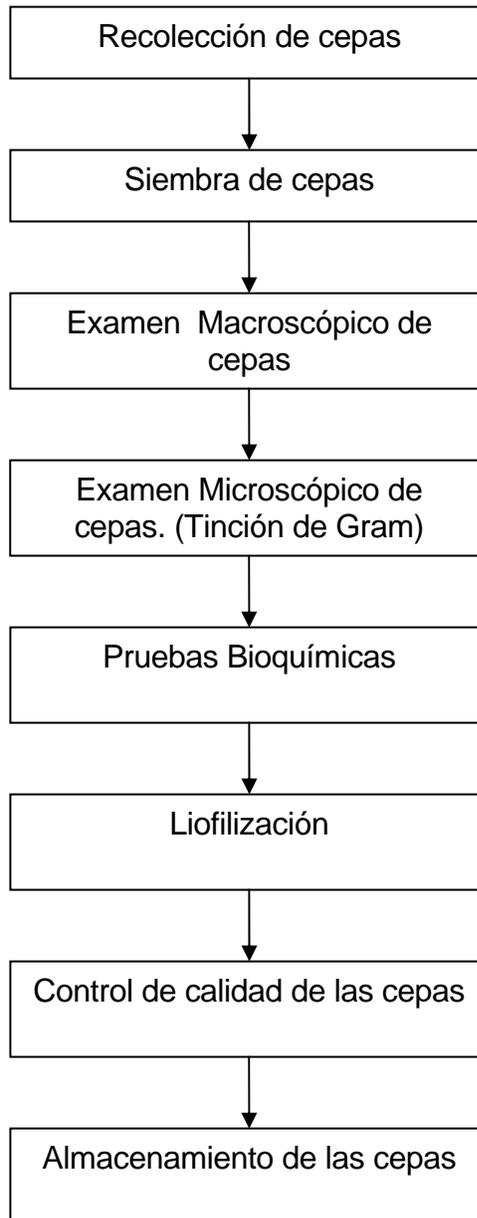


Fig. N° 1. Diagrama de flujo del análisis seguido a cada una de las cepas microbianas.

#### 4.3.1. Recolección de cepas:

A continuación se presenta un cuadro de cepas ATCC y cepas salvajes donadas por diferentes Instituciones gubernamentales, tales como Laboratorio Central Dr. Max Bloch, Hospital Benjamín Bloom, Hospital Zacamil y Hospital Rosales. Estas cepas fueron recolectadas por duplicado tanto en caldo nutritivo como en medios de cultivo agar sangre para el mantenimiento de las mismas, las cuales fueron transportadas en recipientes térmicos (hielera) para lograr que la muestra remitida al laboratorio de control de calidad microbiológico en CENSALUD llegara en las mejores condiciones posibles.

Cuadro N° 3 Listado de cepas ATCC y cepas salvajes donadas al laboratorio de CENSALUD.

CEPAS ATCC	CEPAS SALVAJES
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 12759	<i>Escherichia coli</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella sp</i>
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	<i>Salmonella typhi</i>

#### 4.3.2. Siembra de cepas:

Una vez recolectadas las cepas y llevadas al Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico en CENSALUD, éstas fueron inoculadas siempre por duplicado en el medio de cultivo de mantenimiento de Agar Tripticasa de Soya (TSA), en donde se

observó el crecimiento de las bacterias en un período de 24 horas a una temperatura de 37°C.

#### **4.3.3. Examen Macroscópico de cepas:**

Para realizar el examen macroscópico de las bacterias, se observó la formación de las colonias sobre el medio de cultivo TSA en donde ya habían sido previamente inoculadas, observando características tales como: forma, elevación, margen y color.

#### **4.3.4. Examen Microscópico de cepas (Tinción de Gram):**

Los resultados preliminares basados en la observación de las características de las colonias pueden confirmarse estudiando frotis con tinción de Gram, una técnica relativamente sencilla que consiste en tocar el centro de la colonia a estudiar con el extremo de un asa bacteriológica. La porción de la colonia a examinar se emulsifica en una gota de solución salina en un portaobjeto para dispersar las células bacterianas. La película bacteriana se fija a la superficie de vidrio por medio de calor, que se logra pasando rápidamente el portaobjeto 4 ó 5 veces a través de la llama de un mechero Bunsen. El frotis fijado se coloca sobre una rejilla para tinción y se efectúa la tinción de Gram, que es la tinción mas empleada en el laboratorio de microbiología y permite agrupar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas, lo cual a su vez depende de la estructura de la pared bacteriana. Dando como resultado para las Gram positivas una coloración morada y para las Gram negativas una coloración rosada vistas al microscopio. <sup>(5)</sup> (Ver anexo N° 1)

#### **4.3.5. Pruebas Bioquímicas:**

La diferenciación de especies no puede hacerse solo sobre la base de la tinción de Gram y morfología; por lo cual la diferenciación de las bacterias Enterobacteriaceae se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético de los cromosomas bacterianos.

Estas enzimas dirigen el metabolismo bacteriano a lo largo de una de diversas vías que pueden detectarse con medios especiales usados en técnicas de cultivo in vitro. Los sustratos con los cuales pueden reaccionar estas enzimas se incorporan al medio de cultivo, junto con un indicador que puede detectar la utilización del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. Eligiendo una serie de medios que evalúan diferentes características metabólicas de los microorganismos, es posible establecer un perfil bioquímico para hacer la identificación de especies. <sup>(5)</sup>

Los microorganismos que son incapaces de fermentar glucosa por lo común se detectan por las reacciones que producen en agar - hierro- triple azúcar (TSI).

Las pruebas bioquímicas que se utilizaron para hacer la identificación de bacterias son las siguientes:

Cuadro N° 4. Detección de la fermentación de hidratos de carbono. <sup>(5)</sup>

PRUEBA	MEDIO	REACCION	RESULTADO	COLOR
TSI	Agar Hierro triple azúcar	K/K	Pico de flauta alcalino/ Profundidad alcalina. No fermentación de hidratos de carbono.	Rojo/rojo
		K/A	Pico de flauta alcalino/profundidad ácida. Glucosa fermentada, lactosa ( o sacarosa en TSI) no fermentada.	Rojo/amarillo
		K/A/H <sub>2</sub> S	Pico de flauta alcalino/profundidad ácida (negra). Glucosa fermentada; lactosa no fermentada; y producción de H <sub>2</sub> S.	Rojo/ negro
		A/A	Pico de flauta ácido/profundidad ácida. Glucosa y lactosa (o sacarosa en agar TSI) fermentadas.	Amarillo/ amarillo
		G	Presencia de gas difundido por completo en el medio.	Formación de espacios en el medio.

Cuadro N° 5. Reacciones Bioquímicas para bacterias gram negativas. (5)

PRUEBAS	PRINCIPIO	MEDIO	REACTIVO	RESULTADO
Producción de Indol	El Indol es uno de los productos de degradación del metabolismo del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de clivar triptófano produciendo Indol, Acido Pirúvico y Amoníaco.	Caldo Triptona	Reactivo de Ehrlich o Kovac	Rojo Violáceo
Rojo de Metilo	Las bacterias que siguen la vía de fermentación de ácidos mixtos a menudo producen suficiente ácido para mantener un pH por debajo de 4.4. Esta prueba determina la acidez final del medio de cultivo e identifica especies bacterianas que producen ácidos fuertes a partir de glucosa.	Medio MR-VP	Rojo de Metilo.	Rojo
Voges Proskauer	Se basa en la conversión de acetil-metilcarbinolen diacetil a través de la acción del KOH y O <sub>2</sub> atmosférico. El diacetil es convertido en un complejo coloreado bajo la acción catalítica del $\alpha$ -naftol y creatina.	Medio MR-VP	$\alpha$ - Naftol y KOH	Complejo color Rosado o Rojo

Cuadro N° 5. (Continuación)

PRUEBAS	PRINCIPIO	MEDIO	REACTIVO	RESULTADO
Utilización de Citrato	El principio de la prueba es determinar la capacidad de un microorganismo de utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento. El medio de cultivo contiene azul de bromotimol como indicador de pH, citrato y sales de amonio. La utilización de sales de amonio provoca la liberación de amoníaco lo que eleva el pH virando el indicador verde a azul.	Agar Citrato de Simmons	Azul de Bromotimol	Azul
Motilidad	Las bacterias se mueven por medio de flagelos, cuyo número y ubicación varían entre las especies. La prueba de motilidad se interpreta por medio de un examen macroscópico del medio en busca de una zona difusa de crecimiento que se ensancha a partir de la línea de inoculación.	Medio SIM o MIO		Zona difusa de crecimiento que se ensancha a partir de la línea de inoculación.

Cuadro N° 6. Pruebas de identificación para bacterias gram positivas. <sup>(5)</sup>

PRUEBAS	PRINCIPIO	MEDIO	REACTIVO	RESULTADO
Coagulasa	<p>La coagulasa es una enzima capaz de convertir el fibrinógeno del plasma del humano y otros animales en fibrina.</p> <p>En tubos con plasma se coloca una asada con la colonia y se incuban a 37°C durante 24 horas.</p> <p>Esta prueba se emplea como diagnóstico diferencial entre estafilococos de espe-patógenas y no patógenas.</p>	Plasma citratado		La formación de un coágulo
Catalasa	<p>Se colocan unas pocas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre una colonia. Una efervescencia rápida indica la producción de oxígeno molecular y una prueba positiva. Esta prueba diferencia estafilococos (+) de estreptococos (-)</p>		Peróxido de Hidrógeno al 3%	Formación de burbujas.
Agar sangre	<p>Incubar en agar sangre a 37°C durante 24 horas, se produce colonias <math>\beta</math>-hemolíticas pequeñas, traslúcidas, grises a blancas.</p>	Agar sangre		Colonias $\beta$ -hemolíticas

#### **4.3.6. Liofilización:**

La Liofilización es un proceso que consiste en desecar un producto previamente congelado, lográndose la sublimación del hielo bajo vacío. Es por lo tanto el paso directo del hielo (sólido) a gas (vapor), sin que en ningún momento aparezca el agua en su estado líquido. Se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, mejorando su estabilidad. La reconstitución de un tubo liofilizado se logra agregando caldo nutritivo o el mismo medio que se usó para el crecimiento inicial de las bacterias. <sup>(15)</sup>

El procedimiento para el ensayo de liofilización de las cepas microbianas es el siguiente:

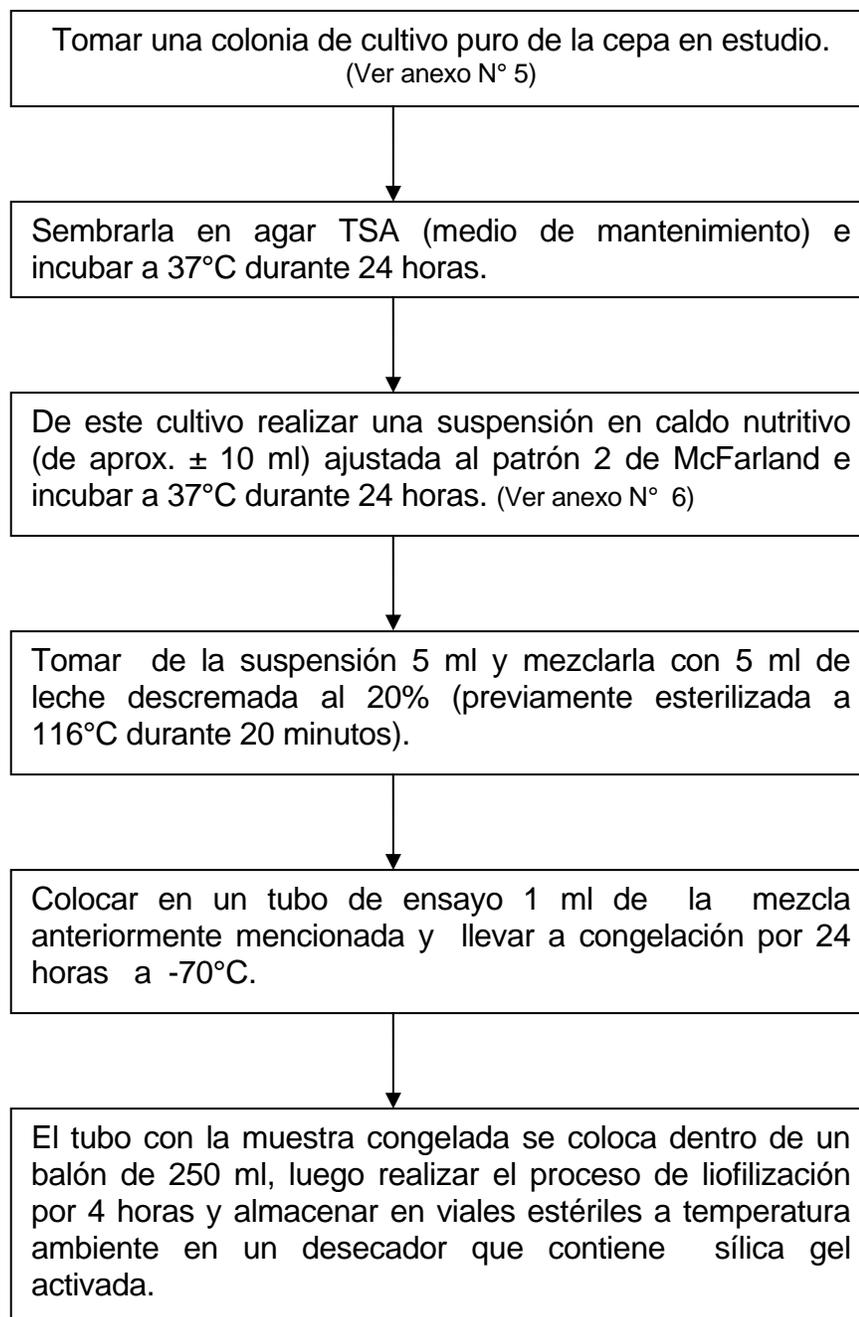


Fig. N° 2. Diagrama de flujo para la realización de la liofilización.

#### **4.3.7. Control de calidad de cepas**

El control de calidad que se realizó a las cepas ya liofilizadas son las mismas pruebas mencionadas anteriormente a partir del numeral 4.3.3 hasta el numeral 4.3.5, este control se realizó con la finalidad de comprobar la estabilidad de las bacterias y demostrar que de la técnica de liofilización como un método de conservación se obtiene un producto con una actividad biológica normal luego de un período largo de almacenamiento a temperatura ambiente.

#### **4.3.8. Almacenamiento de cepas:**

Las cepas liofilizadas fueron almacenadas en viales estériles con capacidad de 2 mL. cada uno, éstos fueron colocados en un desecador que contiene sílica gel activada a temperatura ambiente, debido a que mantiene al liofilizado bajo condiciones mínimas de humedad y esto evita que las bacterias sufran algún daño o lleguen a morir.

Cada vial que contiene a las cepas liofilizadas fue rotulado de la siguiente forma, para su correspondiente identificación:

Nombre de la cepa liofilizada:

Tiempo de liofilización:

Fecha de liofilización:

**CAPITULO V.**  
**RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS

Resultados obtenidos de la Entrevista acerca del Aseguramiento de la Calidad en cepas microbianas en un laboratorio de microbiología:

1. ¿Conoce qué es Aseguramiento de la Calidad en un laboratorio de microbiología?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

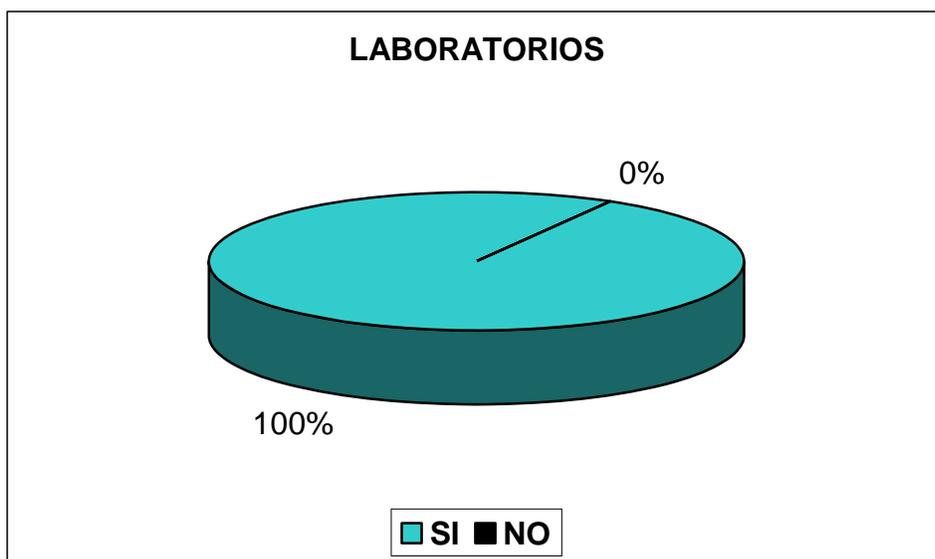


Fig. N° 3. Resultado obtenido de los laboratorios sobre el conocimiento de Aseguramiento de la Calidad.

2. ¿Poseen Aseguramiento de la Calidad en su laboratorio de microbiología?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

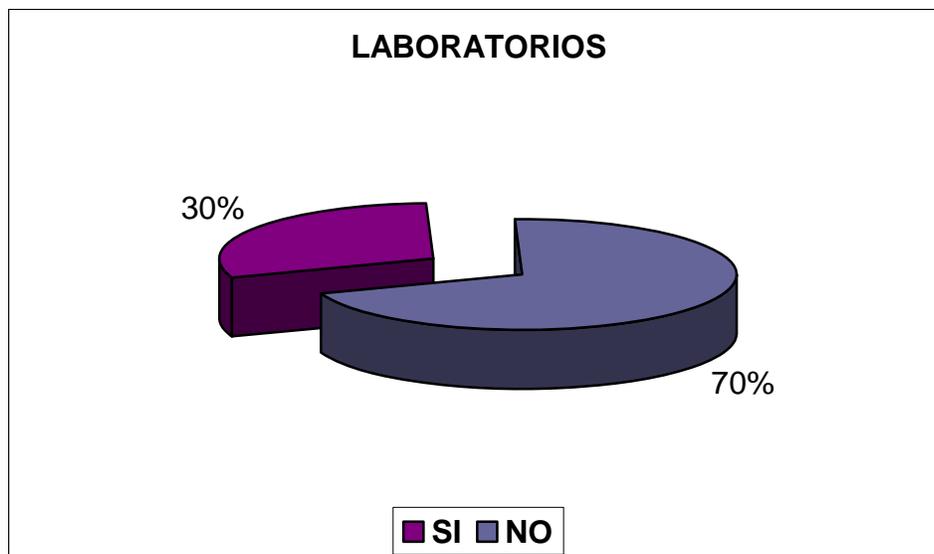


Fig. N° 4. Resultado obtenido de cuántos de los laboratorios entrevistados tienen implementado el Aseguramiento de la Calidad.

Si la afirmación es positiva, ¿Cómo la realizan?

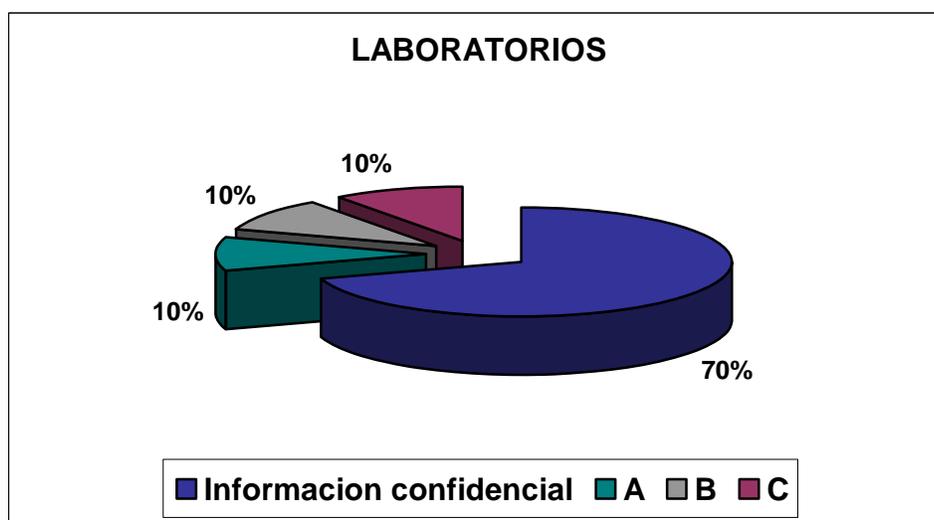


Fig. N° 5. Porcentaje de resultados de los laboratorios que brindaron información de cómo realizan el Aseguramiento de la Calidad.

Cuadro N° 7. Resultados de los parámetros de cómo los laboratorios en estudio realizan el Aseguramiento de la Calidad.

Laboratorios	Resultados
A	Poseen análisis acreditados para medios de cultivo, cepas ATCC y cepas de trabajo. Existen controles de calidad para medios de cultivo, se le realizan ensayos positivos y negativos es decir, bacterias que se sabe crecerán en ese medio y otras que no. Los controles de calidad para cepas ATCC se realizan haciéndoles cada dos meses pruebas bioquímicas, observación de morfología macro y microscópica, tinciones al Gram, y manteniéndolas viables en crioviales con glicerina por un período de tres meses hasta realizar nuevamente lo antes mencionado.
B	Se basan en bioseguridad que incluye instalaciones físicas, condiciones ambientales, limpieza de cada una de las áreas, forma del trabajo del personal (uso correcto de guantes, mascarilla, gabacha, etc), manejo correcto del equipo por el personal así como también el mantenimiento de ellos (cabinas de flujo laminar, cámara de extracción de gases, incubadoras, refrigeradoras, congeladores, autoclaves, etc.). También realizan controles de calidad a medios de cultivo, cepas ATCC, cepas de trabajo, reactivos; todo esto lo realizan a partir de manuales del procedimiento que les indica paso a paso de cómo desarrollar su trabajo dentro del laboratorio.
C	Analizando la calidad de todos los materiales y medios de cultivo mediante procesos analíticos y microbiológicos. Asegurando la eficacia de los filtros HEPA tanto de los aires acondicionados como de la cámara de flujo laminar. Mediante procedimientos validados de limpieza y desinfección de áreas. Así como también la calibración y mantenimiento de todo el equipo involucrados en los procesos mediante patrones reconocidos internacionalmente.

3. ¿Utilizan cepas ATCC en su laboratorio? , ¿Cuáles son las más utilizadas?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

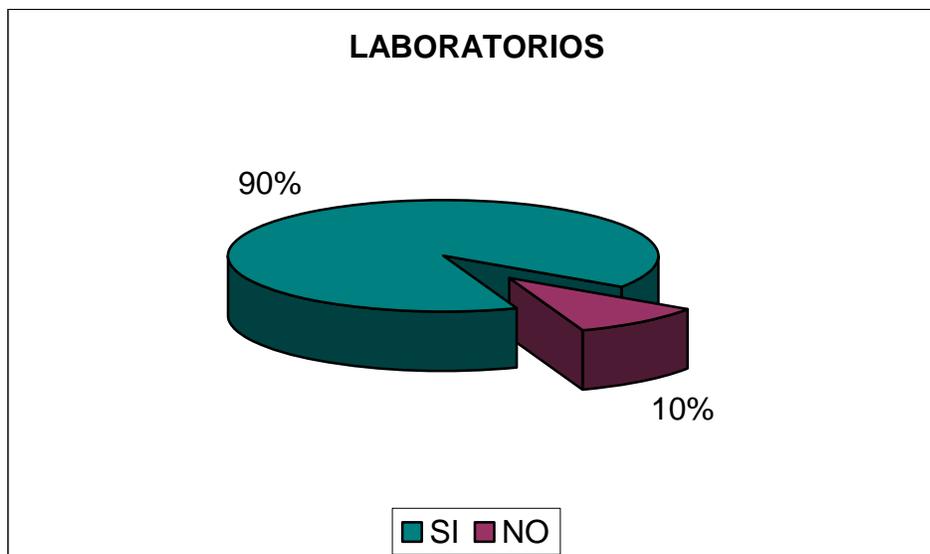


Fig. N° 6. Porcentaje de los laboratorios en estudio que utilizan cepas ATCC.

Cuadro N° 8. Listado de cepas ATCC utilizadas en los laboratorios de Microbiología en estudio.

Laboratorios	Cepas ATCC
SI	<i>Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Sarcina lutea, Pseudomona aeruginosa, Esherichia coli y Salmonella cholerasius, Salmonella typhi, Haemophilus influenzae y Streptococcus neumoneae.</i>
NO	No se cuenta con el servicio de identificación de microorganismos, únicamente se verifica mediante medios selectivos propios para cada uno su presencia o ausencia.

#### 4. ¿Por qué seleccionan este tipo de cepas?

La selección de cepas ATCC dependerá de la actividad a realizar y de la demanda de análisis que se efectúen con más frecuencia, debido a que la mayoría de laboratorios de microbiología que cumplen con Aseguramiento de la Calidad, realizan los ensayos y análisis regidos bajo la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), Métodos oficiales de análisis de la asociación de Químicos (AOAC) y la

Administración de Drogas y Alimentos (FDA) quienes dan la pauta para la selección de cepas para un determinado análisis a realizar.

5. ¿Cuáles son los controles que le realizan a estas cepas?

Se les realiza pruebas bioquímicas para su identificación, tinción al Gram para observar su morfología microscópica y verificar su pureza, viabilidad de la bacteria, es decir, que su crecimiento debe darse entre 18 y 24 horas.

6. ¿Cuáles son los métodos de conservación que se utilizan para estas cepas?

Uso de Crioviales que tienen una duración de hasta tres meses sin pases, picadas profundas en tubos de Agar Tripticosa de Soya (TSA) y en Agar Cetrimide (CTA) y congelación a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

7. ¿Cuál se considera el método de conservación más recomendable?, ¿En qué medio de cultivo lo realizan?

Una de las opciones es el uso de crioviales, ésta posee alrededor de veinte esponjas listas para ser impregnadas de la bacteria que se encuentra en glicerina o caldo nutritivo, esto permite con mayor facilidad extraer una sola esponja en el momento de realizar análisis específicos o controles de calidad, esto ayuda a evitar cualquier tipo de contaminación ya sea para la bacteria en sí como para el analista. Sin embargo el mejor método de conservación de cepas es la Liofilización ya que permite que las bacterias permanezcan viables durante muchos años y los medios a utilizar son glicerol o leche descremada, pero este método en el país no es muy utilizado debido al alto costo del equipo.

8. ¿Cuánto es el tiempo de viabilidad que tienen estas cepas?

En crioviales, tres meses y haciéndole cada mes pruebas de viabilidad. Para el caso de congelación a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  tienen una viabilidad de aproximadamente de cuatro años o más. En la liofilización tiene un período de viabilidad de seis años o más.

9. ¿Cuáles son las aplicaciones que le dan a las cepas ATCC?

- Confirmación de diagnóstico
- Pruebas antimicrobianas (Evaluación de antibióticos)
- Validación de métodos: De procedimientos y medios de cultivos
- Pruebas preparatorias
- Control de calidad de medios de cultivo
- Evaluación de desinfectantes
- Investigaciones

Cuadro N° 9. Resultados de la morfología macroscópica de cepas ATCC y cepas salvajes <sup>(5)</sup> (Ver anexo N° 7)

<b>CEPAS ATCC</b>	<b>MORFOLOGIA DE COLONIAS</b>
<b><i>Bacillus licheniformis</i></b> ATCC 12759	Se observan colonias de forma irregular con elevación umbonada, margen ondulado, consistencia mucoide y viscosa, superficie brillante y rugosa, de color amarillenta.
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 35150	Se observan colonias de forma circular con elevación pulvinada, margen entero, consistencia cremosa, superficie semiopaca y de color de amarillenta a gris.
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 35218	Se muestran colonias de forma circular con elevación pulvinada, margen entero, consistencia cremosa, superficie semiopaca y de color de amarillenta a gris.
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b> ATCC 27853	Crecimiento de colonias de forma irregular, elevación plana, margen lacerado, consistencia viscosa, superficie opaca y de color gris a verdosa.
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> ATCC 25923	Colonias de forma circular, elevación convexa, margen entero, consistencia cremosa, superficie opaca y color amarillo pálido.
<b><i>Salmonella typhi</i></b> ATCC 6539	Se observan colonias de forma circular, elevación convexa, margen entero, consistencia cremosa, superficie traslúcida y color blanco grisáceo.

Cuadro N° 9. (Continuación)

<b>CEPAS SALVAJES</b>	<b>MORFOLOGIA DE COLONIAS</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Se observan colonias de forma circular con elevación pulvinada, margen entero, consistencia cremosa, superficie semiopaca y de color de amarillenta a gris.
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	Crecimiento de colonias de forma circular, elevadas, margen entero, consistencia acuosa, superficie translúcida y color blanquecinas.
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	Crecimiento de colonias de forma irregular, elevación plana, margen lacerado, consistencia viscosa, superficie opaca y de color gris a verdosa.
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	Se muestran colonias de forma circular, elevación convexa, margen entero, consistencia cremosa, superficie opaca y color blancas.
<b><i>Salmonella sp</i></b>	Crecimiento de colonias de forma circular, elevación convexa, margen entero, consistencia cremosa, superficie translúcida y color blanco grisáceo.
<b><i>Salmonella typhi</i></b>	Se observan colonias de forma circular, elevación convexa, margen entero, consistencia cremosa, superficie translúcida y color blanco grisáceo.



Fig. N° 7 Morfología macroscópica de bacterias Gram Negativas.

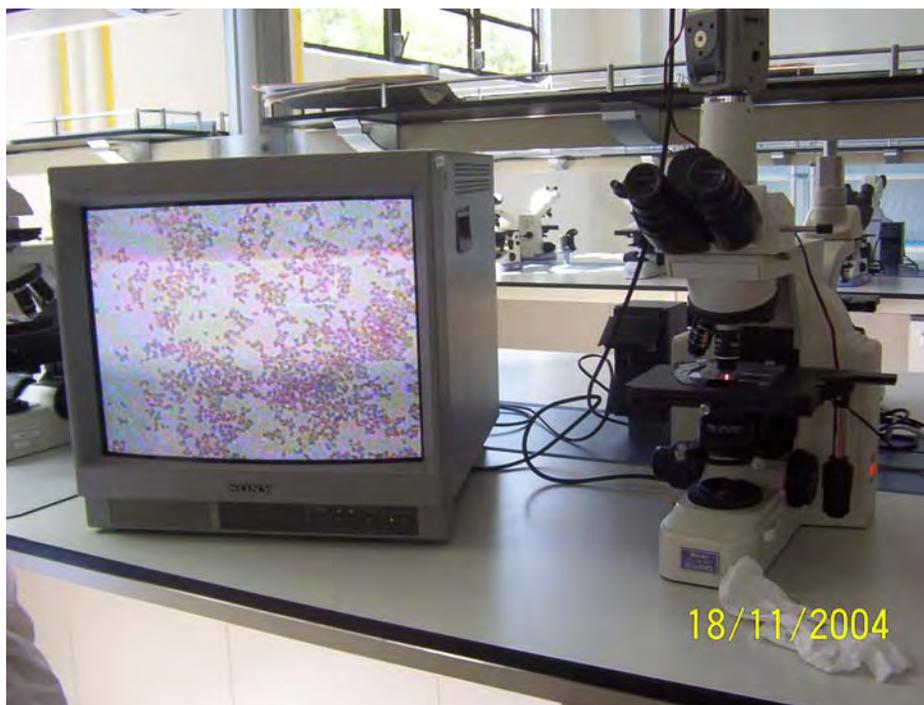


Fig. N° 8 Morfología macroscópica de bacterias Gram Positivas.

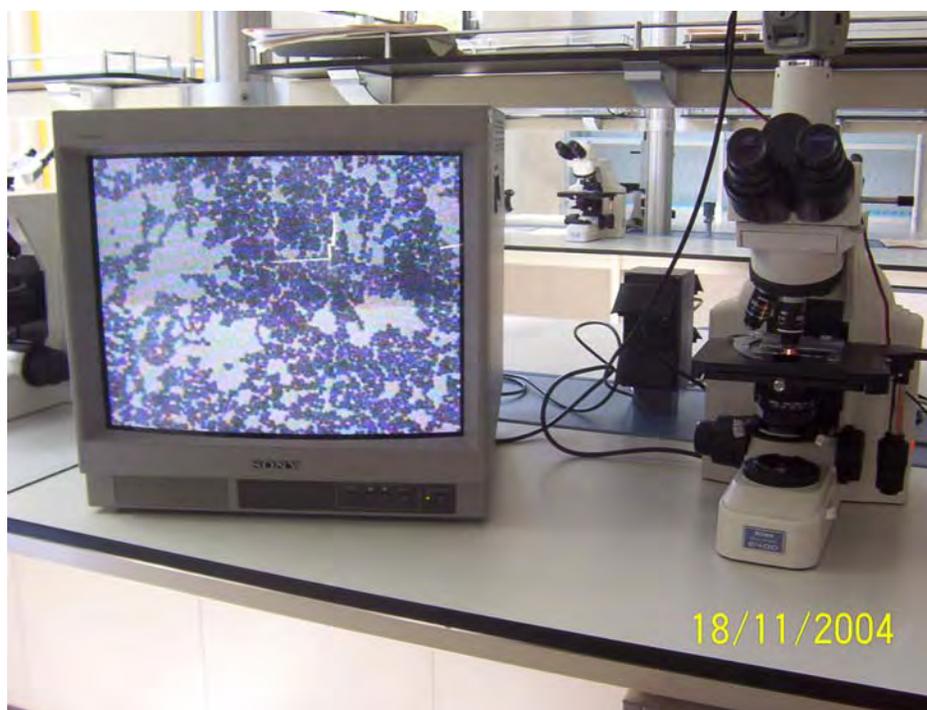
Cuadro N° 10. Resultados de la morfología microscópica de cepas ATCC y cepas salvajes. <sup>(5)</sup>

<b>Bacterias Gram negativas</b>	<b>Morfología Microscópica</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 35150	Se observan bastoncillos cortos que forman cadenas y presentan coloración rosada.
<b><i>Escherichia coli</i></b> ATCC 35218	Son bastoncillos cortos que forman cadenas y presentan coloración rosada.
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Se muestran bastoncillos cortos que forman cadenas y presentan coloración rosada.
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b> ATCC 27853	Se observan bastoncillos que se encuentran de manera aislada en parejas y en cadenas cortas y tienen coloración rosada.
<b><i>Pseudomona aeruginosa</i></b>	Se observan bastoncillos que se encuentran de manera aislada en parejas y en cadenas cortas y tienen coloración rosada.
<b><i>Salmonella sp</i></b>	Son bastoncillos rectos y son de coloración rosada.
<b><i>Salmonella typhi</i></b> ATCC 6539	Son bastoncillos rectos y presentan coloración rosada.
<b><i>Salmonella typhi</i></b>	Son bastoncillos rectos y estos presentan coloración rosada.

<b>Bacterias Gram positivas</b>	<b>Morfología Microscópica</b>
<b><i>Bacillus licheniformis</i></b> ATCC 12759	Se observan bastones largos y finos que forman cadenas cortas de 5 a 6 bastones y presentan coloración morada.
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	Son bastoncillos pequeños y de color morado.
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> ATCC 25923	Son células esféricas que se encuentran distribuidas en grupos irregulares a manera de racimo de uvas y se observan de color morado.
<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	Se observan cocos de forma aislada, en pares, en cadenas cortas o en racimos irregulares y presentan coloración morada.



**Fig. N° 9 Morfología microscópica de bacterias Gram Negativas.**



**Fig. N° 10 Morfología microscópica de bacterias Gram Positivas.**

**TABLA N° 1 RESULTADOS DE PRUEBAS DE IDENTIFICACION PARA BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.**

MICROORGANISMOS	TSI				INDOL	ROJO DE METILO	VOGES PROSKAUER	CITRATO	MOTILIDAD
	BISEL	FONDO	GAS	H <sub>2</sub> S					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150	A	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	A	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	K	K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	K	A	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Escherichia coli</i>	A	A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	K	K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
<i>Salmonella sp</i>	K	A	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
<i>Salmonella typhi</i>	K	A	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)



Fig. N° 11 Prueba en agar Hierro-Triple azúcar (TSI).

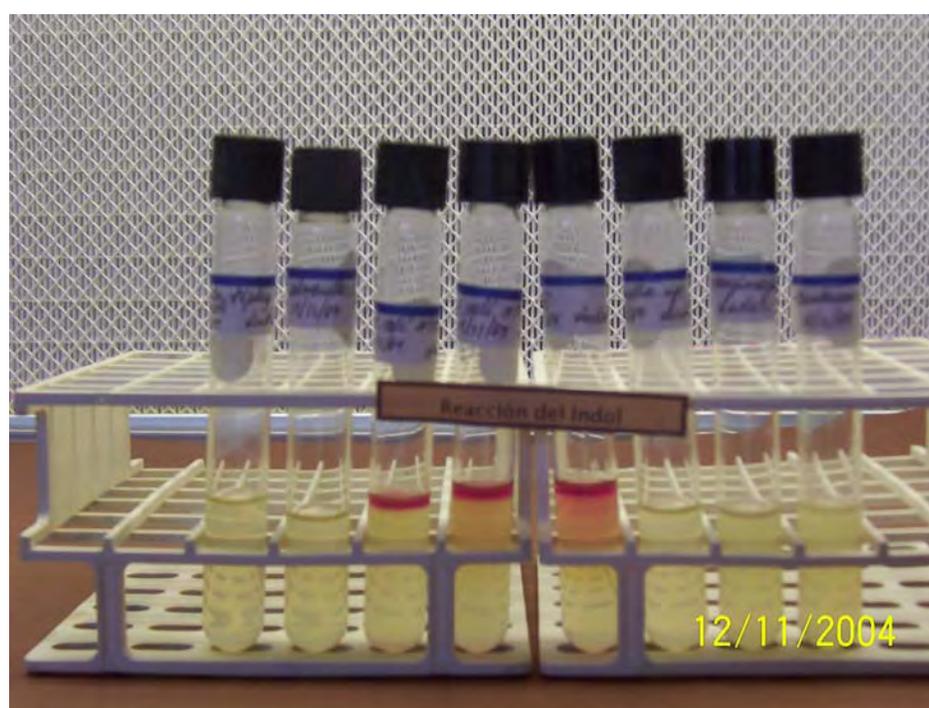


Fig. N° 12 Producción de Indol.



**Fig. N° 13 Reacción de Rojo de Metilo.**



**Fig. N° 14 Reacción de Voges Proskauer.**



**Fig. N° 15 Reacción de Citrato de Simmons.**



**Fig. N° 16 Prueba de Motilidad.**

Cuadro N° 11. Resultados de pruebas de identificación para bacterias Gram positivas <sup>(5)</sup>

MICROORGANISMO	PRUEBA	RESULTADO
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 12759	Motilidad Catalasa	Positivo Positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Catalasa Coagulasa	Positivo Positivo
<i>Listeria monocytogenes</i>	Motilidad Catalasa Coagulasa Agar sangre	Positivo Positivo Positivo $\beta$ – hemolítico
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Catalasa Coagulasa	Positivo Negativo



Fig. N° 17 Prueba de la catalasa.



Fig. N° 18 Prueba de la coagulasa.



Fig. N° 19 Crecimiento en agar sangre de *Listeria monocytogenes*.

### Resultados del proceso de liofilización:

Al realizar el proceso de liofilización se obtuvieron resultados similares para todas las bacterias obteniendo un producto de color blanco, de consistencia porosa, seca y estable a temperatura ambiente y de fácil reconstitución.

El almacenamiento de los liófilos se realizó bajo una cámara de flujo laminar para así evitar cualquier tipo de contaminación tanto para las bacterias como para el analista, y éstas fueron colocadas en viales estériles listas para ser reconstituidas.

Tabla N° 2. Resultados del ensayo preliminar de liofilización de cepas microbianas.

BACTERIA	NUMERO DE VIALES
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 12759	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35150	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	4
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	4
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 6539	4
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	4
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
<i>Salmonella sp</i>	4
<i>Salmonella typhi</i>	4



**Fig. N° 20 Equipo de liofilización del laboratorio de CENSALUD.**



**Fig. N° 21 Balón que contiene al tubo con la muestra de cepas a liofilizar.**



**CAPITULO VI.**  
**DISCUSION DE RESULTADOS**

## 6.0 DISCUSION DE RESULTADOS

- De los 10 laboratorios de microbiología que tienen implementado el Aseguramiento de la Calidad algunos consideran que la entrevista posee preguntas de información confidencial y que no se les permite ser dadas a conocer para así evitar fuga de información.
- Los resultados obtenidos de la entrevista indican que los laboratorios poseen un Aseguramiento de la Calidad adaptado de acuerdo a sus necesidades y a la capacidad económica que poseen.
- La mayoría de los laboratorios utilizan como método de conservación de cepas microbianas los crioviales, sin embargo ellos consideran que el mejor método es la Liofilización porque permite que las bacterias permanezcan viables por muchos años, pero presenta los inconvenientes de poseer un alto costo de instalaciones y equipo, elevado costo energético y es una operación de larga duración.
- Las pruebas bioquímicas y pruebas de identificación realizadas a las bacterias en estudio dieron los resultados esperados a nivel experimental ya que cada una de éstas coinciden con parámetros ya establecidos en la bibliografía investigada.
- Al realizar el proceso de liofilización la bacteria tuvo que ser suspendida en un medio crioprotector para protegerla de la congelación. El resultado final que se obtuvo de la Liofilización de las bacterias en estudio fue una masa de consistencia porosa, seca y de fácil reconstitución en un medio apropiado y lo más importante fue que al reconstituirlas y realizarle el control de calidad éstas se encontraban viables y con sus características fisiológicas y morfológicas originales.

- Al realizar la comparación de las bacterias ATCC con las cepas salvajes de la misma especie no se encontró diferencia alguna tanto en sus características morfológicas como fisiológicas.
- Las bacterias liofilizadas fueron almacenadas en viales estériles para mantener su estabilidad a largo plazo y colocadas en un desecador que contiene sílica gel activada a temperatura ambiente para crear condiciones de humedad con valores inferiores al 1%.
- Existen factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación de cepas bacterianas, como son: tipo de microorganismo, concentración celular, temperatura durante la sublimación, grado de deshidratación alcanzado, atmósfera de oxígeno en el tubo y condiciones de almacenamiento.
- Al realizar el método de conservación de cepas bacterianas por medio de la técnica de liofilización se presentó una serie de ventajas como son la de obtener un producto de fácil, rápida y completa reconstitución con un contenido muy bajo de humedad final, la mayoría de los microorganismos sobreviven al secado, una estabilidad a largo plazo, el cultivo es fácilmente mantenido aún a temperatura ambiente sin pérdida significativa de viabilidad, una rápida disponibilidad de uso, y lo pequeño de los recipientes donde se almacenan las cepas.

**CAPITULO VII.**  
**CONCLUSIONES**

## 7.0 CONCLUSIONES

1. La mayoría del personal de los laboratorios de microbiología acreditados al ser entrevistados presentaron el inconveniente de que por políticas de la empresa no podían dar a conocer información referente al Aseguramiento de la Calidad, por tal razón, los resultados estadísticos no fueron los esperados para la investigación que se realizó.
2. El Aseguramiento de la Calidad requiere de un proceso largo para su implementación, debido a que se va realizando por etapas y las empresas lo van desarrollando de acuerdo a las exigencias propuestas para sí misma y por la competencia que existe con otras empresas.
3. La Liofilización en el país no es muy utilizada debido al alto costo de las instalaciones, equipo, y al elevado costo energético por lo que los laboratorios de análisis microbiológicos se valen de otros métodos de conservación de menor costo como es el uso de crioviales y congeladores que poseen temperaturas de congelación de  $-70^{\circ}\text{C}$ .
4. Las pruebas de identificación y pruebas bioquímicas que se le realizaron a las bacterias son un control de calidad para verificar su pureza, su viabilidad, su capacidad metabólica y comprobar que se trata de la bacteria que se está estudiando.
5. Las bacterias son capaces de soportar bajas temperaturas y conservar aun su viabilidad y sus propiedades biológicas originales a largo plazo, por tal razón se escogió como método de conservación la Liofilización ya que en su procedimiento

se necesita de temperaturas hasta de  $-70^{\circ}\text{C}$  para que pueda llevarse a cabo un proceso óptimo.

6. Al realizar la comparación entre las cepas ATCC y las cepas salvajes mediante las pruebas de identificación y reacciones bioquímicas la única diferencia existente es que las cepas ATCC se encuentran certificadas por instituciones que se encargan de poseer colecciones de cepas que son utilizadas para realizar controles de calidad y cuyas características ya son estudiadas, conocidas y debidamente registradas y las cepas salvajes fueron recolectadas de instituciones de salud (Hospitales).
7. Actualmente la mayoría de los laboratorios se encuentran en el proceso de implementación de Aseguramiento de la Calidad, ya que existen mayores exigencias en la realización de los análisis y en sus resultados, en sus procedimientos y técnicas, en sus instalaciones y equipos, pero sobre todo en la capacidad del personal.
8. La implementación del Aseguramiento de la Calidad en un laboratorio sirve para anticipar los errores antes de que estos se produzcan, garantiza que lo que ofrece cumple con las especificaciones establecidas previamente por la empresa asegurando una calidad continua a lo largo del tiempo.
9. El Aseguramiento de la Calidad resuelve problemas o variaciones que pueden darse dentro de un laboratorio de microbiología; así como también ayuda a prevenir la aparición de defectos que inciden en la calidad total de los resultados, es por ello que se hace necesario crear sistemas de calidad.
10. Con la presente investigación se creó una colección de cepas liofilizadas con lo que se contribuye a aportar al Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico en

CENSALUD, 12 cepas bacterianas distribuidas en un total de 48 viales, las cuales serán utilizadas en diferentes evaluaciones microbiológicas dentro del laboratorio, como también pueden ser propuestas en venta, como un centro de donación de cepas o para los usos que se estimen convenientes.

11. Las cepas liofilizadas podrán ser utilizadas en un futuro para realizar análisis de control de calidad del agua, medicamentos y alimentos dentro del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico en CENSALUD, con el fin de asegurar que un producto o servicio tenga un desempeño adecuado para su correspondiente aplicación.

**CAPITULO VIII.**  
**RECOMENDACIONES**

## 8.0 RECOMENDACIONES

1. Los laboratorios que tengan una mejor apertura y disponibilidad a estudiantes e investigadores para ayudar a la realización de diferentes estudios.
2. Implementar en un cien por ciento el Aseguramiento de la Calidad en todas las actividades que se desarrollan en el laboratorio tales como en los procedimientos, en el método de conservación de cepas, en la evaluación del personal y todos los procesos que se utilizan a fin de asegurar la calidad de todas las operaciones y garantizar resultados que satisfagan las necesidades de la empresa en sí y de sus clientes.
3. Que los laboratorios microbiológicos traten de implementar el método de la Liofilización como un método de conservación de cepas microbianas, no obstante se sabe que este método es de elevado costo pero a pesar de ello ofrece una gran ventaja que es la de obtener cepas viables que duran por un largo período de tiempo (6 años o más), por lo que se considera una buena inversión que garantiza excelentes resultados.
4. En todo laboratorio de microbiología que cumpla con Aseguramiento de la Calidad y que tenga implementado un cepario se recomienda establecer un control de calidad en donde se realicen pruebas de identificación y reacciones bioquímicas ya que los resultados son interpretaciones y evaluaciones basadas en estas pruebas.
5. A los laboratorios de microbiología emplear como una alternativa el uso de cepas salvajes ya que estas pueden ser caracterizadas y ser utilizadas en diferentes análisis de control de calidad y a la vez son de fácil obtención, por lo que la

adquisición de cepas ATCC son más difíciles de obtener por su elevado costo y por el tiempo de envío de las mismas.

6. Que el personal de las empresas reciban constantemente seminarios actualizados acerca del Aseguramiento de la Calidad ya que éste no solo se toma en cuenta en la etapa final de una evaluación, sino en todos los procesos que son utilizados de principio a fin y a esto se le denomina control de calidad dentro de un laboratorio.
7. El Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico en CENSALUD adquiera otras especies de cepas para ampliar la colección, con el fin de llevar a cabo otros análisis e investigaciones que no se pueden realizar con las cepas ya existentes en el laboratorio.

## **BIBLIOGRAFIA**

## **BIBLIOGRAFÍA:**

1. Bonilla G. 1992. Métodos prácticos de inferencia estadística. 2 ed. El Salvador. UCA Editores. p. 91, 92.
2. Carpenter P.L. 1979. Microbiología. 2 ed. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. p.319, 326.
3. Convención Farmacopeíca de los Estados Unidos. 1985. Farmacopea de los Estados Unidos. 21 ed. Estados Unidos, Rockville. p. 1163.
4. Jawetz E. y otros. 1992. Microbiología Médica. 14 ed. México, D.F. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. p. 195-196,199, 205, 207-208, 225, 227, 237-238, 333.
5. Koneman E. W. y otros. 1992. Diagnóstico Microbiológico. 3 ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Panamericana. p. 183-200, 209-211, 215-218, 221 226, 229, 287, 415-416, 418, 454, 460-461, 466-467, 547-548, 690.
6. Pelczar M.J. y otros. 1989. Microbiología. 4 ed. México D.F. Mc Graw Hill. p. 683, 687, 706-707.
7. SCC (Consejos de Estándares de Canadá). 2000. Manual de requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (ISO/IEC 17025-1999). p. 5, 16, 17, 21-23.
8. Williams S. y otros. 1984. Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación de Químicos Oficiales Analíticos (AOAC). 14 ed. Virginia, Estados Unidos. Editorial AOAC. p. 939.

9. ATCC. 2004. Catálogo de Colección de Bacterias. (en línea) Virginia, Estados Unidos. Consultado 17 y 23 feb 2004. Disponible en:  
<http://www.atcc.org>. Y [http://www.atcc.org/Search Catalogs/Bacteria.cfm](http://www.atcc.org/Search%20Catalogs/Bacteria.cfm)
10. Castanhon S. 2001. Gestión de la Calidad para Laboratorios: Guía para la Implantación y la Acreditación. (en línea). La Paz, Bolivia. Editorial Edobol. Consultado 21 feb. 2004. Disponible en:  
[http:// www.infobol.com/oba/pdf/gestlab.pdf](http://www.infobol.com/oba/pdf/gestlab.pdf)
11. Gras N. Control y Garantía de la Calidad en Laboratorios Analíticos. (en línea). Consultado 19 mar. 2004. Disponible en:  
<http://www.vrid.usach.cl/ima/ngras.htm>
12. Lloret A. y otros. La Calidad en el Laboratorio de Microbiología: Una propuesta de Aplicación Práctica. (en línea). Valencia, España. Consultado: 23 ene. 2004. Disponible en:  
[http://calidad.svamc.org/CAL\\_CONTROL\\_02.HTM](http://calidad.svamc.org/CAL_CONTROL_02.HTM).
13. Martínez G. Fundamentos y Técnicas en Análisis Microbiológicos. (en línea) Salamanca, España. Consultado 21 feb 2004. Disponible en:  
<http://html.rincondelvago.com/analisis-microbiologico.html>.
14. Mateos P. F. Mantenimiento y Conservación de Microorganismos Industriales. (en línea). Consultado 11 mar 2004. Disponible en:  
<http://edicion-micro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema04MI.html>
15. Romero P. Química, Estufa y Liofilización. (en línea) México. Consultado 11 mar 2004. Disponible en:  
<http://html.rincondelvago.com/estufa-y-liofilizacion.html>

16. Uruburu F. 1999. La Sociedad Española de Microbiología y el Aseguramiento de la Calidad Microbiológica. (en línea) Valencia, España.

Consultado 23 ene 2004. Disponible en:

[http://www.semicro.es/Actualidad/SEM28\\_12.pdf](http://www.semicro.es/Actualidad/SEM28_12.pdf)

17. Uruburu F. La Conservación de Cepas Microbianas. (en línea). Consultado 8 mar. 2004. Disponible en:

<http://www.cect.org/docs/cons.doc>

18. <http://www.monografias.com/trabajos/mmbiologia/mmbiologia.shtml-101k>

Manual de Control de Calidad en Microbiología Clínica. (en línea).

Consultado 23 ene 2004.

## **GLOSARIO**

## GLOSARIO

### Cepas ATCC:

Es una colección americana de cultivos tipo, certificadas, las cuales son adquiridas a través de Organizaciones reconocidas mundialmente (American Type Culture Collection) y son utilizadas como cepas de referencia. <sup>(18)</sup>

### Cepas salvajes:

Son aquellas que han sido recolectadas de hospitales y obtenidas a partir de pacientes portadores de estas bacterias.

### Crioviales:

Son viales o cápsulas utilizados para la conservación de las bacterias por un período de tres meses, y poseen alrededor de veinte esponjas listas para ser impregnadas de la bacteria, se encuentran dispersas en glicerina o caldo nutritivo. <sup>(17)</sup>

### Liófilo:

Es el producto deshidratado que se obtiene por congelación, es decir es el resultado del proceso de liofilización. <sup>(15)</sup>

## **ANEXOS**

## ANEXO N° 1

### **TINCIÓN DIFERENCIAL DE GRAM.** <sup>(6)</sup>

Es la tinción más empleada en el laboratorio de bacteriología y permite agrupar a las bacterias Gram positivas y Gram negativas según resistan o no el proceso de coloración, lo cual a su vez depende de la estructura de la pared bacteriana.

La tinción consta de los siguientes pasos:

- Tinción primaria con cristal violeta, que coloreará a todas las bacterias, se cubre la preparación por un minuto, luego lavar con agua.
- Mordiente (Lugol), proceso químico que fija el colorante a la pared bacteriana, aplicar por un minuto.
- Decoloración (alcohol-acetona), usando un solvente no polar que actuando a nivel de pared permitirá la salida del colorante en las bacterias con pared membrana externa y capa delgada de peptidoglucano o sea en los Gram negativos, aplicar de 15-20 segundos, luego lavar con agua.
- Contratinción, usando safranina o fucsina que teñirá las bacterias decoloradas por medio minuto.
- Lavar con agua y secar cuidadosamente.

## ANEXO N° 2

### CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS BACTERIAS. <sup>(4)</sup>

#### **Género *Staphylococcus*:**

Los ***Staphylococcus*** son células grampositivas, esféricas de cerca de 1 µm de diámetro que suelen estar distribuidas en grupos irregulares a manera de racimo de uvas, son microorganismos no móviles, y no forman esporas, crecen con facilidad en la mayor parte de los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerófilas. Crecen con mayor rapidez a 37°C, producen catalasa, fermentan con lentitud muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas. Las colonias desarrolladas en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. El ***Staphylococcus aureus*** forma colonias de color gris a amarillo dorado intenso y las colonias de ***Staphylococcus epidermidis*** son grises a blancas.

#### **Género *Escherichia*:**

Son bastoncillos gram negativos cortos que pueden formar cadenas. ***Escherichia coli*** forma colonias circulares, convexas y lisas con bordes definidos. Produce de manera típica pruebas positivas a indol, descarboxilasa de la lisina y fermentación del manitol, lo mismo que gas a partir que la glucosa. Produce hemólisis en agar sangre, morfología típica de las colonias con un resplandor iridiscente en los medios diferenciales como agar eosina y azul de metileno (EMB). Se caracteriza por la capacidad para reducir los nitratos a nitritos y para fermentar la glucosa con producción de ácido o ácido y gas, son negativos a la oxidasa.

**Género *Salmonella*:**

Se trata de bastoncillos móviles que fermentan la glucosa y la manosa sin producir gas, no fermentan la lactosa ni la sacarosa, la mayoría producen ácido sulfhídrico.

**Género *Bacillus*:**

Producen endosporas, crecen bien en agar sangre, produciendo colonias gris blanquecino, grandes, extendidas, de márgenes irregulares. La mayor parte de las especies producen catalasa.

**Género *Listeria*:**

*Listeria monocytogenes* es un bacilo grampositivo corto, que no forma esporas, es anaerobio facultativo y positivo a la catalasa, produce ácido pero no gas en presencia de diversos carbohidratos tiene un movimiento rotatorio de un extremo a otro a 22°C, crece en medios como agar de Mueller-Hinton.

**Género *Pseudomona*:**

Son bastoncillos aerobios gramnegativos móviles, algunos de los cuales producen pigmentos solubles en agua, miden aproximadamente 0.6 por 2 µm, se encuentran de manera aislada, en parejas y en cadenas cortas. *Pseudomona aeruginosa* es un aerobio obligado que produce en ocasiones un olor dulzón o de uvas. Forma colonias redondas, lisas, con color verdoso fluorescente, crecen a temperatura que oscila entre 37 a 42°C, es positiva a la oxidasa y no fermenta los carbohidratos.



### ANEXO N° 3

#### UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

#### ENTREVISTA ACERCA DEL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN CEPAS MICROBIANAS EN UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.

1. ¿Conoce qué es Aseguramiento de la calidad en un laboratorio de microbiología?

SI\_\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_

2. ¿Poseen Aseguramiento de la calidad en su laboratorio de microbiología?

SI\_\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_

Si la afirmación es positiva, ¿Cómo la realizan?

3. ¿Utilizan cepas ATCC en su laboratorio?

SI\_\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_

¿Cuáles son las más utilizadas?

4. ¿Por qué seleccionan este tipo de cepas?

5. ¿Cuáles son los controles de calidad que le realizan a estas cepas?

6. ¿Cuáles son los métodos de conservación que se utilizan para estas cepas?

7. ¿Cuál se considera el método de conservación más recomendable?, ¿En que medio de cultivo lo realizan?
  
8. ¿Cuánto es el tiempo de viabilidad que tienen estas cepas?
  
9. ¿Cuáles son las aplicaciones que le dan a las cepas ATCC?

## **ANEXO N° 4**

Listado de laboratorios entrevistados que cumplen con Aseguramiento de la Calidad:

1. FERSON
2. MORAZÁN
3. ANCALMO
4. VIJOSA
5. TERAMED
6. SUIZOS
7. RODIM
8. Instituto de Investigación y desarrollo Químico Biológico (IQB)
9. Laboratorios Especializados en Control de Calidad (LECC)
10. Laboratorio Central Dr. Max Bloch

## ANEXO N° 5

### METODO PARA AISLAMIENTO DE CULTIVO PURO

#### TECNICA DE SIEMBRAS POR ESTRIAS EN PLACA DE PETRI <sup>(4)</sup>

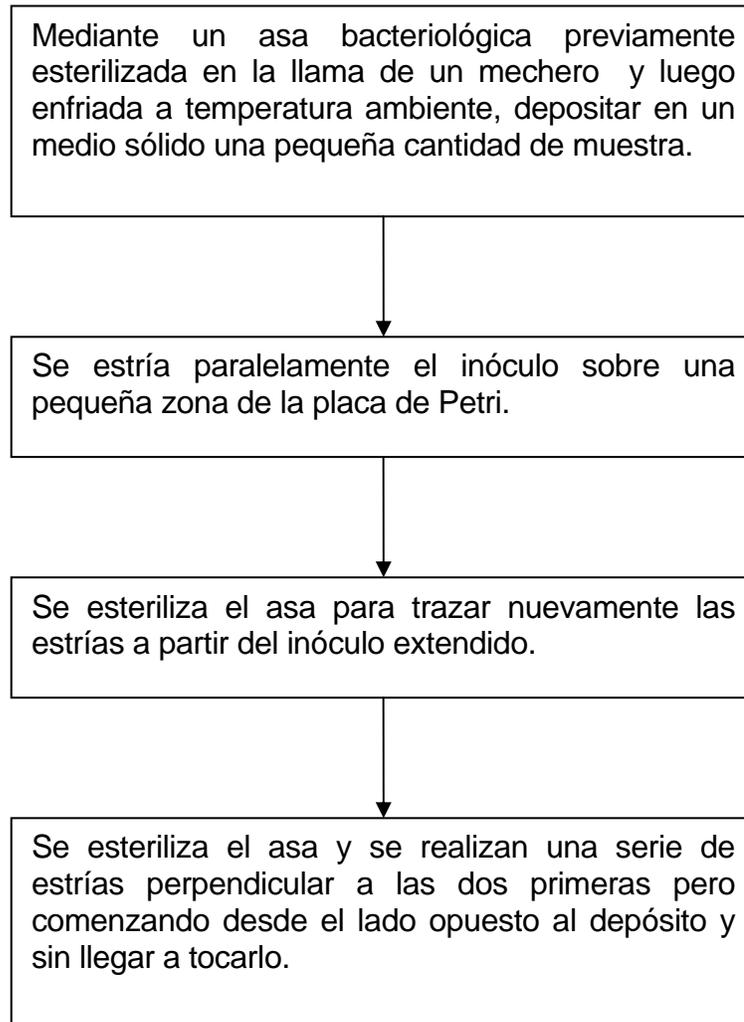


Fig. N° 25 Diagrama de flujo del método de siembra para la obtención de cultivo puro.

## ANEXO N° 6

### ESCALA DE McFARLAND <sup>(2)</sup>

#### Materiales:

10 tubos rosca de 16 \* 150 mm.

Solución de Cloruro de Bario al 1% (BaCl<sub>2</sub>)

Solución de Ácido Sulfúrico al 1% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

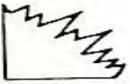
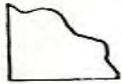
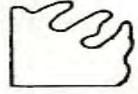
#### Procedimiento:

1. Preparar diez tubos de ensayo de igual tamaño y perfectamente limpios y enjuagados.
2. Preparar ácido sulfúrico al 1 %.
3. Preparar una solución acuosa al 1 % de cloruro de bario.
4. Agregar la cantidad indicada de ambas soluciones a los tubos, tal como se señala en la siguiente tabla, hasta tener un total de 10 mL. por tubo.
5. Cerrar herméticamente los tubos. Se observa un precipitado de sulfato de bario en suspensión, lo que se evidencia por una turbidez diferente para cada tubo.

Tabla N° 3. Escala de McFarland.

Tubo	BaCl <sub>2</sub> (mL)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL)	[ ] bacteriana*10 <sup>8</sup>
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
<b>2</b>	<b>0.2</b>	<b>9.8</b>	<b>6</b>
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

## ANEXO Nº 7

Forma	puntiforme		irregular	
	circular		rizoide	
	filamentosa		como huso	
Elevación	elevada		pulvinada	
	plana		umbonada	
	convexa		umbilicada	
Margen	entero		lacerado	
	ondulado		filamentoso	
	lobulado		rizado	

**Fig. Nº 26** Términos usados para describir la morfología de colonias