

1. Bacteriología

- **Esterilización:** eliminación o muerte de todos los microorganismos que contiene un objeto o sustancia, y que de encuentran acondicionados de tal forma que no pueden contaminarse nuevamente.
- **Sanitizante:** agente que disminuye la carga microbiana total a un nivel el cual es seguro para la salud de la población. Sólo es aplicable sobre objetos inanimados.
- **Desinfectante:** agente que elimina la carga microbiana total en superficies inanimadas tales como habitaciones.
- **Antiséptico:** agente que controla y reduce la presencia de microorganismos potencialmente patógenos sobre piel y/o mucos (solo pueden aplicarse externamente sobre seres vivos)

1.1 Agentes antibacterianos esterilizantes y/o desinfectantes

- Provocan pérdida de viabilidad en los microorganismos
 - Físicos(calor, radiaciones)
 - Químicos(óxido de etileno, formaldehído, agentes oxidantes, soluciones antisépticas.)
- 2. Provocan una separación de los microorganismos de la sustancia líquida
 - ♦ Filtración(se eliminan los microorganismos presentes en el fluido)

2. RECURSOS MATERIALES

2.1 Equipamiento:

Los laboratorios estarán dotados de las instalaciones que, debidamente legalizadas.

Se dispondrá de un registro de aparatos y de un manual de funcionamiento y un plan de mantenimiento actualizado de los equipos e instrumental.

El control de calidad en el laboratorio de Microbiología Clínica implica la monitorización de los medios e instrumentos.

1. Debe realizarse y mantenerse actualizado un inventario de todos los equipos del laboratorio.
2. Mantener un registro o ficha de todos los equipos que intervengan directa o indirectamente en los ensayos. Debe constar al menos la siguiente información:
 - Nombre del equipo.
 - Fabricante y número de serie o identificación.
 - Fecha de adquisición.
 - Fecha de puesta en servicio.
 - Emplazamiento habitual.
 - Estado a su adquisición.
 - Planes y procedimientos de mantenimiento y calibración.
 - Historial.
3. Cada instrumento del laboratorio deberá tener su procedimiento de funcionamiento y puesta en marcha debidamente documentado por escrito. Los procedimientos se recogerán mediante documentos individuales: plantilla normalizada o mediante un manual de procedimientos. No es aconsejable utilizar únicamente las instrucciones del fabricante sino que cada procedimiento debe ser revisado y expresado por escrito, en función de las características de cada laboratorio.
4. Es necesario un Plan de mantenimiento de todos y cada uno de los equipos, indicando las actividades a

realizar y su periodicidad.

- Los procedimientos de mantenimiento son instrucciones escritas.
- Debe distinguirse entre mantenimiento preventivo y correctivo.
- Todas las actividades de mantenimiento deben quedar registradas.
- Deben existir procedimientos para la identificación de equipos con limitaciones, averiados o fuera de servicio.
- Estos equipos no pueden ser utilizados hasta que sean reparados y reconocidos como aptos por el responsable de equipos.
- El programa de revisiones periódicas, debe especificar el procedimiento de esas revisiones, averías u otras incidencias.
- Medidas de protección personal en cuanto al manejo de aparatos y equipos (uso de centrífugas, cabinas de flujo laminar, etcétera).

2.2 Recomendaciones para un buen mantenimiento y funcionamiento de equipos:

Los equipos del laboratorio deben funcionar de forma que se asegure la reproducibilidad de los resultados de las pruebas diagnósticas. Se designará un responsable y se realizará un inventario. Protocolo de actuación.

Se dispondrá de protocolos que incluyan:

- Descripción del instrumento, fundamento de sus funciones.
- Precauciones especiales para su uso y, si las hubiese, las consideraciones ambientales.
- Accesorios y reactivos utilizados en los instrumentos.
- Calibraciones.
- Procedimientos rutinarios de control de calidad.
- Sugerencias para el uso rutinario.
- Dudas.
- Referencias y lecturas suplementarias.
- Protocolo recordatorio de fechas de control de calidad.

2.2.1 Registro del chequeo de los aparatos:

Debe ser lo primero a realizar diariamente. El control de temperaturas mediante la observación de ésta en los medidores de temperatura colocados para ello en cada equipo, se realizará diariamente, registrándose en un documento en el que consta el equipo de que se trata, el día, la temperatura, la persona responsable de la medición. En las observaciones se debe anotar si hay desviaciones y, si superan los rangos de tolerancia especificados previamente, las medidas que se han tomado y si se ha informado de tal anomalía al supervisor o al responsable de calidad si lo hubiese.

2.2.2 Mantenimiento preventivo:

Se deberá protocolizar.

Se sugiere asignar cada instrumento a un técnico.

El mantenimiento de los equipos y los resultados de las peticiones se registrará, como se ha indicado, mediante registro escrito en libro o papel, o mediante sistemas informáticos, y se guardará durante un mínimo de 2 años.

2.2.3 Calibración de los equipos según los patrones nacionales e internacionales:

- Medida de temperatura: Baños, incubadoras, frigoríficos, congeladores, estufas, autoclaves y todos los equipos en los que la temperatura es un factor importante para los resultados, deben estar dotados

de un dispositivo para la toma de la temperatura. Dichos dispositivos deben ajustarse a la normativa nacional o internacional. Se mantendrá un registro diario de la temperatura registrando, igualmente, los incidentes si los hubiera.

Actividades temperatura-dependientes: calibrar el termómetro. Los aparatos que no se usan diariamente, precisarán del control de temperatura en el momento en que se usen.

- Medida de presión: autoclaves.

- Medida de tiempo y temperatura de ciclos de esterilización: en función de la carga.

- Pesas y balanzas: mediante patrones nacionales e internacionales. En balanzas de precisión se consideraran las condiciones ambientales y/o de ubicación.

Las balanzas se calibrarán anualmente mediante unas pesas patrón para las balanzas y, las centrífugas, con un tacómetro calibrado. Es recomendable que se haga con periodicidad anual y se genere un certificado de calibración.

- Ph-metros: verificación mediante disoluciones tampón normalizadas. Revisar periódicamente el funcionamiento de los electrodos.

- Higrómetros: cuando la humedad sea un factor importante en el resultado del ensayo, se calibraran éstos ajustándolos a patrones nacionales o internacionales.

- Cabinas de flujo laminar: se verificará periódicamente la velocidad de aire, estado de filtros y control microbiológico de esterilidad del aire. Comprobar además la estanqueidad.

- Anemómetros: calibrar los que miden el flujo de aire en las cabinas.

- Equipo volumétrico: dispositivos como dispensadores, pipetas automáticas, etcétera, se verificaran periódicamente y se registrará esa verificación.

- Equipo de anaerobiosis: jarras, cámaras. Se verificará la consecución de anaerobiosis.

2.3 Material Fungible:

El Decreto recoge la obligatoriedad de disponer de un registro de material fungible, actualizado, y que recoja las siguientes características:

- Control de entradas.

- Control de salidas.

- Lugar de almacenaje.

- Condiciones de conservación.

- Control de caducidad.

El registro de material fungible ha de estar actualizado. La principal utilidad que puede tener el registro de material fungible es saber que tipo de material utilizamos y que secciones de nuestro laboratorio lo usan.

3. Cultivo de los microorganismos: Medios de cultivo

3.1 Diseño de los medios de cultivo

A la hora de diseñar un medio de cultivo no sólo hay que tener en cuenta los nutrientes y las condiciones físicas que permitan el crecimiento de los microorganismos.

3.1.1 Aporte de nutrientes

La cantidad y naturaleza de los nutrientes en un medio de cultivo viene determinada por el rendimiento de un producto en especial además de los requerimientos nutricionales del microorganismo.

3.1.2 pH

Un microorganismo puede alterar el pH del medio de cultivo como resultado de las sustancias producidas por el propio microorganismo; por ejemplo:

Utilización de carbohidratos ----> Producción de ácidos orgánicos ----> Acidificación

Estos cambios pueden llegar a ser tan grandes que inhiban el crecimiento del microorganismo. Estos cambios se pueden prevenir controlando el pH mediante sistemas tampón.

3.1.3 Necesidades de gases

Los gases principales que afectan al desarrollo microbiano son el oxígeno y el dióxido de carbono. Las bacterias presentan una respuesta amplia y variable al oxígeno libre clasificándose en cuatro grupos:

1. **Aerobias:** bacterias que se desarrollan en presencia de oxígeno libre.
2. **Anaerobias:** bacterias que se desarrollan en ausencia de oxígeno libre.
3. **Anaerobias facultativas:** bacterias que se desarrollan tanto en presencia como en ausencia de oxígeno libre.
4. **Microaerófilas:** bacterias que crecen en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno libre.

Para desarrollar bacterias aerobias se incuban los medios de cultivo en agitación constante o introduciendo aire estéril en el medio.

Los anaerobios estrictos son muy sensibles al O₂ por lo que se debe evitar la exposición de estos microorganismos al O₂. Se puede obtener un ambiente de anaerobiosis por los siguientes métodos:

- A. Agregando al medio de cultivo un compuesto reductor, como es el tioglicolato sódico, para disminuir el contenido de O₂.
- B. – Quitando el O₂ por procedimientos mecánicos y reemplazándolo por N₂ o CO₂.
- C. Mediante reacciones químicas dentro del recipiente que contiene el medio de cultivo inoculado para combinar el oxígeno libre con otro compuesto. Por ejemplo: al encender una vela se transforma el oxígeno en dióxido de carbono.

3.1.4 Suministro de luz

Los organismos fotosintéticos deberán ser expuestos a una fuente de iluminación ya que la luz es su fuente de energía. Esta fuente de iluminación no debe plantear problemas de variación de temperatura, por lo que suelen usarse lámparas fluorescentes con un desprendimiento mínimo de calor.

3.1.5 Control de la temperatura

El desarrollo de las bacterias depende de reacciones químicas, y la velocidad con que se efectúan estas reacciones está influenciada por la temperatura, por lo que la temperatura puede en parte determinar la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Cada especie microbiana posee una temperatura óptima de crecimiento clasificándose según esto en los siguientes grupos:

1. **Psicrófilas:** capaces de desarrollarse a 0° C o menos. Su temperatura óptima es alrededor de los 15°

C.

2. Mesófilas: crecen mejor entre 25 y 40° C.

3. Termófilas: crecen mejor entre 45 y 60° C.

3.1.6– Otros requerimientos

Halófilas: bacterias que para su crecimiento requieren altas concentraciones de sal (10 – 15%). Son aquellas bacterias aisladas del mar y ciertos alimentos.

Otras bacterias, como las aisladas en las fosas marinas, requieren presiones superiores a las normales.

3.2 Tipos de medios de cultivo

3.2.1 Estado:

A.– Medios líquidos

B.– Medios sólidos: Llevan un agente solidificante (Agar) que es un polisacárido ácido producido por ciertas algas rojas que gelifica por debajo de 45° C. Se usa a una concentración del 1,5%.

C.– Medios semisólidos: Agar a una concentración del 0,7%.

2.– Composición:

A.– Medios sintéticos o químicamente definidos. Llevan fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales que suplan iones, otros elementos como son estimuladores del crecimiento pero siempre a concentraciones conocidas.

B.– Medios complejos o de composición indefinida. Estos medios llevan ingredientes como extracto de levadura, peptona, infusión de cerebro, extracto de carne, etc. que contienen nutrientes en abundancia pero sin saber con exactitud la composición cualitativa ni cuantitativa de estos nutrientes.

C.– Medios de enriquecimiento. Son medios complejos (normalmente) con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Ejemplo: adición de sangre, suero o extractos de tejidos de animales y plantas.

D.– Medios selectivos. Son aquellos que favorecen por su diseño el crecimiento específico de un microorganismo particular (o grupo de microorganismos). Es de gran utilidad para el aislamiento de microorganismos a partir de una población microbiana mixta. Ejemplo: CO₂ como fuente de carbono es selectivo para autótrofos; adicionando cristal violeta se inhibe el crecimiento de los Gram (+); utilizando maltosa como única fuente de carbono sólo crecerán los que usen maltosa.

E.– Medios diferenciales. Son aquellos destinados a facilitar la discriminación de microorganismos de una mezcla por sus propiedades diferenciales de crecimiento en dichos medios. Ejemplo: Agar sangre diferencia hemolíticos de no hemolíticos; McConkey diferencia lactosa (+) de lactosa (-).

F.– Medios de mantenimiento. Suelen ser distintos a los de crecimiento óptimo ya que el crecimiento rápido y prolífico suele ocasionar la muerte rápida de las células. Ejemplo: al añadir glucosa y utilizarla los microorganismos producen ácidos, acidificándose el medio por lo que es

preferible no utilizar glucosa en los medios de mantenimiento.