

CCI-SEIMC-00

RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Concepción Gimeno Cardona

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia y Facultad de Medicina.
Universidad de Valencia. Avda Blasco Ibáñez, 17. 46010-Valencia. Teléfono: 96 3987823. Fax:
96 3987836. E-mail: concepcion.gimeno@uv.es

Índice

1. CCI-SEIMC-00: Objetivos
2. CCI-SEIMC-01: Control Interno de Calidad en las fases pre y postanalítica
3. CCI-SEIMC-02: Control Interno de Calidad en medios de cultivo y reactivos
4. CCI-SEIMC-03: Relación y uso de cepas de referencia
5. CCI-SEIMC-04: Control Interno de Calidad en equipos
6. CCI-SEIMC-05: Control Interno de Calidad en estudios de sensibilidad
7. CCI-SEIMC-06: Control Interno de Calidad en Micobacteriología Clínica
8. CCI-SEIMC-07: Control Interno de Calidad en Micología Clínica
9. CCI-SEIMC-08: Control Interno de Calidad en Parasitología Clínica
10. CCI-SEIMC-09: Control Interno de Calidad en Virología Clínica
11. CCI-SEIMC-10: Control Interno de Calidad en Serología de las enfermedades infecciosas
12. CCI-SEIMC-11: Control Interno de Calidad en Microbiología Molecular
- 13.- Anexo autores por orden alfabético

1. INTRODUCCIÓN: JUSTIFICACIÓN

El Grupo de Gestión en Microbiología (GEGMIC) pretende que una de sus actividades sea la elaboración de documentos o guías con recomendaciones sobre determinados temas de calidad que no están claramente protocolizados ni consensuados por los microbiólogos clínicos. Muchos son los temas en que habíamos pensado, pero decidimos que podíamos empezar por normalizar y documentar las pautas a seguir para el control de calidad interno. Para ello, nos reunimos un grupo de personas interesadas en estos aspectos y comenzamos la ardua tarea de documentar lo que de forma habitual hacemos en la mayoría de los laboratorios de Microbiología, intentando mejorarlo, siguiendo las recomendaciones de otras sociedades, de ENAC y con la colaboración de otros grupos de estudio de la SEIMC, como MICOMED y GEMARA.

Se decidió denominar al documento como "Recomendaciones para el Control de Calidad Interno en Microbiología Clínica" e identificarlo como la Guía de Calidad CCI-SEIMC. La versión 1 del documento completo se repartirá durante la reunión del Grupo de Gestión en Microbiología Clínica, que tendrá lugar en Bilbao. Tras esta presentación el documento será incluido en la página *web* de GEGMIC durante un mes para que pueda ser leído y se hagan las pertinentes aclaraciones, consultas y modificaciones hasta obtener un documento aceptado por todos y que pueda servir como base para la acreditación de los laboratorios de Microbiología Clínica.

La Junta Directiva de GEGMIC agradece a los participantes el esfuerzo desarrollado en la elaboración del documento de recomendaciones para el control de calidad interno en Microbiología Clínica y reconoce la gran calidad de las aportaciones. Asimismo, agradece la colaboración de Abbott Científica por la subvención de dos reuniones de preparación.

Decidimos dividirlo en varios capítulos, uno que abarcara a las fases preanalítica y postanalítica y subdividir la fase analítica en las distintas partes de la microbiología. Los capítulos desarrollados son: Control Interno en la Fase Preanalítica y Postanalítica, Control de medios y reactivos, Cepas de referencia, Control de equipos, Control interno en estudios de sensibilidad, Micobacteriología Clínica, Micología Clínica, Parasitología Clínica, Virología Clínica, Serología de las enfermedades infecciosas y Microbiología Molecular.

Para que las revisiones periódicas de cada capítulo sean factibles sin modificar la estructura del documento global, se ha editado con numeración independiente para cada capítulo, con un índice general sin paginar. Cada capítulo comienza desarrollando su índice específico y se estructura como máximo en tres subapartados. Los autores figuran al comienzo del capítulo que en el que han colaborado y en un anexo final donde están recogidos por orden alfabético.

2. OBJETO

El programa de control interno de calidad asegura que la información generada por el laboratorio es exacta, adecuada y reproducible. Permite alertar a los profesionales del laboratorio de Microbiología Clínica de posibles resultados insatisfactorios, que pueden y deben ser corregidos.

Antes de implantar un programa de control de calidad interno, el laboratorio debe definir las estrategias de diseño e implantación, debe definir sus especificaciones de calidad analítica, así como seleccionar los métodos y equipos adecuados y conocer los puntos críticos para mantener un funcionamiento estable y fiable de los procesos analíticos.

El establecimiento de un programa de control de calidad interno, permite pues monitorizar con carácter continuo las actividades del laboratorio, la verificación puntual de los resultados de cada lote de reactivos, de cada serie analítica, así como de los equipos. Refleja las desviaciones del sistema sometido a control y permite la toma de decisiones.

El propósito de las presentes recomendaciones es establecer las directrices para asegurar la calidad en los procedimientos de Microbiología Clínica en lo que afecta tanto al procesamiento inicial de las muestras como a los procesos analíticos, incluyendo los controles de medios y reactivos necesarios en las diversas técnicas analíticas. Asimismo, este documento establece las recomendaciones generales sobre la dotación y condiciones estructurales adecuadas para algunos aspectos de los laboratorios de Microbiología Clínica.

3. ALCANCE

Las recomendaciones se aplicarán a los diferentes procedimientos o ensayos que se realizan para diagnosticar las infecciones en los laboratorios de Microbiología Clínica.

4. PERSONAL

Los análisis deben ser realizados por personal técnico cualificado con experiencia en Microbiología.

La supervisión de los análisis y la interpretación de los resultados debe realizarse por personal facultativo especialista en Microbiología Clínica.

CCI-SEIMC-01

RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN LAS FASES PREANALÍTICA Y POSTANALÍTICA

Javier Aznar Martín¹ y Elena Loza Fernández de Bobadilla²

¹Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla. Apdo 914. 41080 Sevilla.

²Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Carretera de Colmenar, km 9. 28034 Madrid.

Índice

Índice

Objeto

Alcance

Personal

Fase Preanalítica

- Hoja de petición
- Cita para la toma de muestras
- Obtención de las muestras
- Preparación de las muestras
- Transporte de las muestras
- Recepción de las muestras
- Requisitos de las muestras
- Criterios de aceptación/rechazo de las muestras
- Registro de solicitudes
- Preparación de las muestras
- Conservación de las muestras

Fase Analítica

- Validación clínica de los resultados
- Elaboración y edición del informe
- Transporte del informe
- Distribución del informe
- Recepción del informe

Cuadro resumen

Objeto

El objeto de las presentes recomendaciones, tras analizar las diferentes tareas que deben realizarse desde que se solicita una prueba al laboratorio de Microbiología Clínica hasta que el solicitante recibe el informe, es la descripción de las normas que garanticen la realización de todas las tareas de forma impecable y coordinada, teniendo en cuenta las expectativas de los profesionales que en ellas participan.

El objetivo final es asegurar que el proceso asistencial del laboratorio de Microbiología permita obtener unos resultados de calidad, adecuando el proceso a las necesidades de los diferentes clientes del mismo.

Alcance

Es el conjunto de actuaciones necesarias para la correcta obtención, transporte y conservación de las muestras, así como la elaboración de criterios de recepción y de aceptación/rechazo de las mismas garantizando, al mismo tiempo, la máxima información de utilidad clínica para la óptima aplicación de las técnicas de diagnóstico microbiológico a muestras biológicas de origen humano.

La gran cantidad de profesionales y actividades implicadas en el proceso asistencial de los laboratorios de Microbiología Clínica exige una actuación coordinada entre los diferentes estamentos que participan en dicho proceso, tanto de asistencia primaria como especializada, incluyendo a profesionales sanitarios y no sanitarios.

Estas recomendaciones deben extenderse desde la prescripción de un estudio por un facultativo hasta la recepción por el mismo de un informe con el resultado diagnóstico.

Personal

La obtención de las muestras debe ser realizada por personal facultativo y de enfermería siguiendo las normas recogidas en el "Manual de extracción, toma y transporte de muestras" elaborado por el Servicio de Microbiología.

El personal que realiza el transporte de las muestras debe estar habilitado para ello y tener establecida una relación contractual que determine condiciones, custodia y tiempos de transporte, así como poseer formación específica para el transporte de muestras biológicas.

FASE PREANALÍTICA

1.- Hoja de petición

El documento o volante de solicitud deberá ser:

- Simple y fácil de cumplimentar.
- Único para cada muestra y estudio/prueba solicitado.
- Que permita la identificación inequívoca del paciente, muestra y estudio/prueba solicitado.

Para ello, el volante de solicitud deberá especificar de forma legible todos los datos de identificación del paciente (número de historia clínica, de la seguridad social o DNI, nombre completo y ubicación, servicio solicitante, médico solicitante, tipo de muestra (descripción completa y método de obtención), fecha y hora de recogida, diagnóstico, motivo de la petición, antibioterapia previa y precisar el estudio o prueba solicitada.

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-01

Realizado: Grupo Colaborador de GEGMIC Fecha: 16-05-04 Versión: 1 Pág. 4/10

Las pruebas solicitadas deben estar incluidas en la Cartera de Servicios del Laboratorio de Microbiología y ser adecuadas a las características clínicas del paciente según las indicaciones de Protocolos consensuados, Algoritmos de Decisión, Guías de Práctica Clínica, etc.

El médico informará al paciente, según las instrucciones que se describen en la Cartera de Servicios, sobre:

Pruebas solicitadas.

Lugar y hora de la toma de muestras.

Condiciones de preparación previas para la toma de muestras.

Suministro de recipientes adecuados, si fuera necesario.

En pruebas que requieran consentimiento informado: entrega y explicación del documento específico.

2.- Cita para la toma de muestras

1. Adecuada en día y hora a las necesidades del paciente.
2. Registro de los datos sin errores administrativos.
3. Atención personalizada, amable y correcta.
4. Indicación del lugar y hora de la toma de muestras, así como de las condiciones de preparación previas.
5. Suministrar recipientes adecuados si fueran necesarios.

3.- Obtención de las muestras

1. Requisitos de los centros o salas de obtención de muestras:
 - Área de extracciones y toma de muestras, sala de espera para los pacientes y servicios de higiene correspondientes.
 - Los profesionales encargados de la extracción y toma de muestras dispondrán de:
 - Manual de extracción, toma y transporte de muestras elaborado por el Servicio de Microbiología.
 - Contenedores adecuados y en perfectas condiciones.
 - Horario de extracciones y recogida de muestras acorde a sus características.
 - Normas de seguridad biológica para la eliminación de contenedores y elementos potencialmente peligrosos.
 - Normas de trabajo que garanticen la seguridad del trabajador.
2. El personal de los centros o salas de extracción estará legalmente habilitado y demostrará sus capacidades y competencias para la toma y recepción de muestras.
3. En general:
 - Se comprobará siempre la correspondencia entre la solicitud y la identidad del paciente.
 - Se verificará si el documento de solicitud contiene todos los datos identificativos.
 - Se rechazarán aquellas solicitudes que no estén cumplimentadas con todos los datos imprescindibles de identificación del paciente y pruebas solicitadas, y que no puedan ser subsanadas en el momento de la extracción.
 - Se registrarán los datos de identificación de la persona que realiza la extracción de la muestra, la hora y la fecha de la misma, así como los incidentes que se hayan producido.
 - Se identificarán los contenedores en el momento de la obtención de la muestra, siguiendo las normas básicas establecidas en el Manual de obtención de muestras.

4.- Preparación de las muestras

1. Preparación del envío:
 - En el punto de extracción se confeccionará un registro diario de recogida y transporte de muestras en el que estén relacionados los contenedores remitidos por cada solicitud.
 - El registro incluirá el nombre de la persona que ha preparado el envío, la hora en que se recoge y quién realiza el transporte.
 - Una copia del registro quedará en el centro de extracción y otra acompañará a las muestras (hoja de ruta).
 - Al llegar al laboratorio, la persona que recoge las muestras deberá firmar y hacer constar la hora de recepción.
2. Existirá un registro de custodia legal, cumpliendo los requisitos necesarios para el transporte de muestras, con implicaciones judiciales, según la normativa legal vigente.

5.- Transporte de las muestras

Existirá un sistema unificado de transporte de muestras entre los puntos de extracción y el laboratorio de Microbiología.

1. Toda muestra de origen humano es potencialmente infecciosa y el transporte debe efectuarse de acuerdo a las siguientes normas:
 - Muestras:
 - Transporte en contenedores herméticos que eviten el riesgo de infección al personal que los manipule y su posible contaminación externa.
 - Los contenedores deben transportarse verticalmente y cerrados. El sistema de transporte evitará la agitación mecánica.
 - Neveras/contenedores:
 - Dotadas de relleno absorbente.
 - Identificación externa de que contienen material de riesgo biológico.
 - Contenedor estanco y opaco a la luz.
 - Mantenimiento de la temperatura adecuada para cada muestra (neveras termostatzadas). Control de temperatura con termómetro de máxima y mínima.

El transporte debe ser lo más rápido posible. Si no fuera así, se utilizarán condiciones de preparación y conservación adecuadas de acuerdo con las especificaciones de la Cartera de Servicios y el Manual de extracción, toma y transporte de muestras.

2. Deben establecerse normas de actuación en caso de accidente o avería en el transporte, así como las medidas de seguridad biológica.
3. En caso de transporte de muestras entre laboratorios, seguir las normas del laboratorio de "destino". Es responsabilidad del laboratorio de "origen" el cumplimiento de las normas necesarias para garantizar que la muestra llegue en perfectas condiciones para su estudio.
4. En el transporte de las muestras se seguirán las siguientes normas específicas:
 - Del domicilio al centro: Control de temperatura y tiempo de transporte, especificado en la Cartera de Servicios.
 - Del punto de extracción periférico al laboratorio:
 - Control de temperatura y tiempo de transporte, especificado en la Cartera de Servicios.
 - Transporte intrahospitalario:

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-01

Realizado: Grupo Colaborador de GEGMIC Fecha: 16-05-04 Versión: 1 Pág. 6/10

- Manual: Control de temperatura y tiempo de transporte, especificado en Cartera de Servicios.
 - Neumático:
 - a Evitar sistemas con paradas intermedias para disminuir aceleraciones/desaceleraciones.
 - b Llenar los tubos al máximo (según instrucciones del fabricante) para disminuir la agitación.
 - Entre laboratorios:
 - Seguir PNT del laboratorio de "destino".
5. Personal que realiza el transporte:
- Transportista:
 - Personal habilitado para el transporte de muestras con relación contractual que determine condiciones, custodia y tiempos de transporte.
 - Formación específica para el transporte de muestras biológicas.
 - Actuar durante el transporte según las normas del laboratorio.
 - Priorizar el transporte de muestras sobre otras tareas.
 - Celador/Paciente/Familiar:
 - Se les indicarán las normas a seguir durante el transporte especificadas en la Cartera de Servicios del laboratorio.

6.- Recepción de las muestras

El laboratorio dispondrá de un Manual de Normas de recepción y aceptación de muestras.

1. Recepción de muestras procedentes de centros de extracción:

1.1. Entrega por el transportista:

- El transportista entregará las muestras y los volantes de solicitud.
- Firmará en la hoja de ruta y anotará la hora de entrega.
- Registrará en la hoja de ruta cualquier incidencia durante el transporte.
- Obtendrá copia de la hoja de ruta firmada por el responsable de la recepción, en la que se especificará si hay rechazos y la causa.

1.2. Recepción:

- El responsable de la recepción debe confirmar la entrega de las muestras y las solicitudes.
- El responsable debe recoger las incidencias comunicadas por el transportista.

2. Recepción de muestras obtenidas en el hospital, procedentes de centros de extracción o entregadas directamente por el paciente/familiar:

- Comprobación de la correspondencia de la muestra con la solicitud.

7.- Requisitos de las muestras

El laboratorio de Microbiología debe determinar si la muestra cumple los requisitos para ser procesada según el Manual. Entre otros, incluyen:

- Correcta identificación.
- Comprobación de la idoneidad de la muestra para la realización completa de las pruebas solicitadas.
- Condiciones adecuadas de transporte y conservación.

Las muestras y/o solicitudes que no se adapten a las normas de calidad preanalíticas establecidas en el Manual serán rechazadas.

8.- Criterios de aceptación/rechazo de las muestras. Protocolos de decisión

Deben estar establecidos en el Manual. Las incidencias más frecuentes y las acciones a realizar son las siguientes:

1. Muestra deficientemente identificada. Se contactará con el servicio peticionario.
 2. Muestra derramada. Se solicitará nueva muestra.
 3. Transporte/conservación inadecuado. Se solicitará nueva muestra.
- El laboratorio tendrá la capacidad de rechazar una muestra o una solicitud que considere inadecuada para realizar un determinado diagnóstico de acuerdo con los protocolos de decisión.
 - Ante una solicitud oral de ampliación de estudios siempre debe existir la autorización de un facultativo del laboratorio y registrarse la prueba solicitada en la petición previa, indicando la fecha de la ampliación, así como el nombre del médico que la solicita.
 - Se dispondrá de un sistema de registro de incidencias en el que figure la muestra implicada, el tipo de incidencia, la persona con la que se contacta del servicio solicitante y la resolución de la incidencia.

9.- Registro de solicitudes

Si una muestra es apta para ser procesada, se procederá al registro de los datos del volante de petición, de forma manual o en soporte informático, según el procedimiento establecido en el Laboratorio.

El sistema informático de gestión del laboratorio deberá cumplir unas especificaciones referentes a fiabilidad y diferentes niveles de acceso a la información. Deberá, asimismo, garantizar la trazabilidad y la confidencialidad de los datos (ley de protección de datos).

10.- Preparación de las muestras

- Clasificación de las muestras en función del laboratorio o rutina de destino.
- Centrifugación de las muestras según las especificaciones de las normas internas del laboratorio.
- Decapsulación de tubos según las especificaciones de las normas internas del laboratorio, teniendo en cuenta los aspectos de seguridad biológica.
- Preparación de alicuotas. Identificación del tubo principal y de las alicuotas (código de barras o identificación propia de cada laboratorio o rutina).
- Preparación de otras muestras biológicas según los PNT específicos para los diferentes estudios.

11.- Conservación de las muestras tras su procesamiento

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

FASE POSTANALÍTICA

1.- Validación clínica de los resultados

En esta última actuación antes de la entrega del informe se estudia la congruencia del resultado del informe o de varios resultados de un mismo informe, se cotejan los resultados con los de informes precedentes y se verifica su coherencia con los datos fisiológicos y clínicos del paciente. Esta validación clínica ha de realizarla un especialista en Microbiología.

La validación clínica incluye la repetición o ampliación de exploraciones.

La firma de la persona autorizada que valida el informe puede establecerse a través de sistemas electrónicos o autorizaciones escritas que garanticen la identidad de la persona que valida.

2.- Elaboración y edición del informe

Una vez comprobados los resultados, el facultativo especialista en Microbiología aportará al informe los comentarios que considere necesarios para:

- Ayudar a la interpretación de los mismos.
- Indicar nuevas exploraciones.
- Aconsejar pautas clínicas.

El informe puede ser provisional o definitivo y debe indicarse en el mismo esta circunstancia.

Todo informe de laboratorio será editado tras ser completado por lo menos una vez.

3.- Transporte del informe

Debe garantizarse la confidencialidad de los datos en todo momento.

- Entrega de resultados:

Se entregarán en el plazo establecido por la Cartera de Servicios para cada prueba.

Resultados urgentes: se establecerá el mecanismo adecuado que garantice la recepción del informe, por parte del facultativo responsable del paciente, en el menor plazo posible desde su edición.

Instaurar sistemas que permitan entregar los resultados directamente en el destino final, con el fin de agilizar la entrega y evitar pérdidas.

- Sistemas de transporte:

- Informe impreso y reparto manual. Registro donde quede constancia de la persona que hace el reparto y la que lo recibe (hoja de ruta de informes).

- Informe electrónico. Cuando el envío se realice por sistema electrónico (intranet, web, correo electrónico, fax, impresión remota) se establecerán medios alternativos en previsión de fallos en dichos sistemas.

4.- Distribución del informe

- La distribución se hará de forma que se facilite la llegada rápida a su destinatario. El Coordinador del Laboratorio implantará estrategias que eviten errores de destino, recogidas en el manual correspondiente que editará el laboratorio dentro de su documentación.

- En caso de que se produzcan errores en la entrega y distribución de resultados, estos quedarán reseñados en un registro de reclamaciones para su análisis y proposición de las acciones correctoras pertinentes.
- Si se emite un duplicado de informe, la fecha de emisión debe ser la de la impresión original del mismo, haciendo constar que se trata de una copia y la fecha de la misma.
- Los informes son confidenciales, por lo que el laboratorio instaurará los mecanismos que garanticen que todo el personal mantendrá un estricto control de la custodia y confidencialidad de los datos del paciente.
- El laboratorio establecerá los procedimientos correspondientes para garantizar la trazabilidad del proceso de información de los resultados.

5.- Recepción del informe

- La recepción de los informes quedará registrada en la hoja de ruta de recepción de los informes.
- Se comprobará la recepción de todas las peticiones realizadas.
- Se registrarán las reclamaciones sobre informes no recibidos o incompletos indicando motivo y procedencia.

RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN LAS FASES PREANALÍTICA Y POSTANALÍTICA. CUADRO RESUMEN

Normas de obligado cumplimiento

1.- El Servicio de Microbiología tiene que elaborar y revisar anualmente los siguientes documentos:

- a) Manual de extracción, toma y transporte de muestras biológicas para el diagnóstico microbiológico.
- b) Cartera de servicios.
- c) Criterios de aceptación/rechazo de muestras biológicas.
- d) Normas de seguridad biológica.

Estos documentos tienen que ser revisados anualmente por el Director del laboratorio.

Las modificaciones de estos documentos o la inclusión de nuevos protocolos tienen que ser autorizados por el Director de Laboratorio.

Los manuales tienen que estar disponibles en todas las áreas donde se realicen extracciones de muestras para diagnóstico microbiológico.

2.- En la hoja de petición tienen que cumplimentarse todos los datos identificativos del paciente.

Tiene que existir una identificación inequívoca de la muestra y el volante de solicitud de estudio/prueba.

3.- En todas las áreas de extracción de muestras tiene que haber disponibilidad de contenedores estériles y de cierre hermético.

4.- Durante todo el proceso de transporte tienen que mantenerse las condiciones de conservación de la muestra. No se puede exceder el tiempo máximo establecido en la Cartera de Servicios desde la obtención de la muestra hasta su recepción en el Servicio de Microbiología.

5.- La elaboración de cualquier tipo de informe y su validación clínica tienen que ser realizados exclusivamente por un especialista en Microbiología Clínica.

Recomendaciones

Todas las normas recogidas en el documento a excepción de las reseñadas en el epígrafe anterior.

CCI-SEIMC-02

Recomendaciones sobre el aseguramiento de la calidad de medios de cultivo y reactivos

Consuelo Miranda¹ , Lorena López² , Ana Lloret Caballeria³ y Amparo Farga Marti⁴

¹Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Avda de la Fuerzas Armadas s/n. Granada. 18014. Teléfono 958 020465. Correo electrónico: consuelo.miranda.sspa@juntadeandalucia.es

²Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Avd Dr. Fedriani s/n. Sevilla. 41009. Teléfono 955 008138. Correo electrónico: lorenalc@terra.es

³Unidad de Microbiología. Hospital Arnau de Vilanova. Valencia. Teléfono 96 3868504. Correo electrónico: lloret_ana@gva.es

⁴Unidad de Microbiología. Hospital Arnau de Vilanova. Valencia. Teléfono 96 3868504. Correo electrónico: afarga@teleline.es

El presente documento se distribuye como copia no controlada

Índice

Objetivo y alcance	3
Personal	3
Condiciones ambientales	3
Programa de limpieza	3
Manuales de Procedimientos	4
Control de calidad interno de los medios de cultivo preparados en el laboratorio	4
a) Control de los medios deshidratados y de los aditivos comerciales	4
b) Control de la preparación de los medios de cultivo o aditivos	5
c) Control del medio preparado	5
Control de calidad interno de los reactivos preparados y comerciales empleados en el laboratorio	11
Documento técnico de utilización	11
Etiquetado	11
Reactivos preparados en el laboratorio	11
Reactivos listos para su uso	12
Reactivos de tinción	12
Controles aceptados	13
Frecuencia de control	13
Resumen de las recomendaciones	15
Referencias	16
Anexo 1. Listado de cepas para control de algunos Medios de Cultivo más comunes	17
Anexo 2. Listado de cepas para control de los reactivos más comunes	21

Objetivo y alcance

El objetivo de este documento es normalizar las actividades que deben realizarse en el laboratorio de Microbiología para controlar la idoneidad de los medios de cultivo y reactivos utilizados, antes de su puesta en uso. Este control abarca tanto a los preparados en el propio laboratorio como los preparados listos para su uso por las casas comerciales. La verificación de los medios y reactivos, indicación de uso y seguimiento debe estar adecuadamente documentada.

FUNDAMENTO

El control de calidad de los medios de cultivo y reactivos forma parte del programa de control de calidad interno del laboratorio de microbiología para asegurar que la información generada por el laboratorio es exacta, segura y reproducible.

Personal

La elaboración y control de los medios y reactivos deben ser realizados por personal técnico cualificado con experiencia en Microbiología.

La supervisión de los análisis y la interpretación de los resultados debe ser realizada por un titulado superior con la especialidad de Microbiología Clínica. Como norma general es conveniente seguir estos principios:

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

Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales requeridas para desarrollar los ensayos relacionados con el control específico de medios y reactivos son similares a las de cualquier laboratorio de Microbiología.

Programa de limpieza

El programa de limpieza es similar al del laboratorio general de Microbiología.

Manuales de Procedimientos

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

Control de calidad interno de los medios de cultivo preparados en el laboratorio

- Debe abarcar todo el proceso, no solo el control del medio ya preparado sino también el control del medio deshidratado y los aditivos que se van a utilizar, el procedimiento de la elaboración, el envasado, etiquetado y almacenamiento de los medios así como todos los registros.
- Todas las fases del proceso han de estar perfectamente documentadas y debe mantenerse un registro detallado de todas las operaciones realizadas. Se anotarán todos los controles realizados, los resultados de los mismos y las medidas adoptadas así como el nombre de la persona que realiza los controles y las medidas.

a) Control de los medios deshidratados y de los aditivos comerciales

En la recepción:

la persona que recibe el producto:

- comprobará la fecha de caducidad
- indicará la fecha de recepción en el envase
- lo almacenará en las condiciones adecuadas

Cada vez que vayan a ser utilizados:

la persona que los vayan a utilizar comprobará:

- que estén conservados en su lugar adecuado de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.
- fecha de caducidad
- que los recipientes estén perfectamente cerrados.

b) Control de la preparación de los medios de cultivo o aditivos

Preparación:

Los medios de cultivo y los aditivos serán preparados, envasados y almacenados siguiendo estrictamente las instrucciones de los procedimientos de trabajo o en su defecto las instrucciones de los fabricantes.

Como normas generales hay que tener en cuenta que existen una serie de factores que afectan negativamente el buen funcionamiento de los medios:

- Sobrecalentamiento de los ingredientes basales
- Adición de la sangre o de otros aditivos sensibles al calor por encima de 50°C
- Envasar menor cantidad de medio que la recomendada

Identificación:

Cada lote de medio o aditivo preparado se marcará en su envase (placa o tubo) de forma inequívoca según se determine en el procedimiento de trabajo de cada laboratorio. Esta marca debe permitir la identificación del tipo de medio de que se trata, del lote y de la fecha de preparación.

Almacenamiento:

Los medios se almacenarán en las condiciones adecuadas establecidas (T° ambiente, frigorífico 2-8°C o congelador -20°C).

Los medios en placa deben guardarse en bolsas de plástico bien cerradas.

Puede afectar negativamente:

- Almacenar a una T° no adecuada
- Alternar la T° de almacenamiento de T° ambiente a 2-8°C.
- Almacenar las placas en bolsas abiertas o mal cerradas.
- Cerrar la bolsa contenedora de las placas antes de que estas se hayan enfriado y gelificado apropiadamente

Registro:

De cada lote de medio de cultivo o de aditivo preparado se llevará un registro

c) Control del medio preparado

Sistemáticamente, de todos los medios preparados en el laboratorio antes de ponerlo en uso, se controlará:

- Características físicas (aspecto, color, excesivo nº de burbujas, precipitados etc..)
- Esterilidad

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica CCI-SEIMC-02

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 6/22

- Funcionamiento para el cual ha sido preparado: propiedades bioquímicas (diferenciales y diagnósticas), recuperación de los microorganismos deseados e inhibición o supresión de los microorganismos no deseados
- Se registrarán los resultados obtenidos de estos controles así como la persona que los ha realizado.

Control de esterilidad

Tomar una muestra del 5% de los lotes de 100 o menos placas/tubos y una muestra de 10 de los lotes de más de 100 placas/tubos.

Incubar durante 48h a la T° a la que va a ser incubado en el uso con muestra clínicas y posteriormante otras 48 h a T^a ambiente.

Control del funcionamiento

Consiste en comprobar la capacidad del medio de recuperar un bajo número de los microorganismos más sensibles para los que ha sido preparado, la capacidad de inhibir un alto número de los microorganismos que deben ser inhibidos en caso de los medios selectivos y de diferenciar los microorganismos para los que ha sido diseñado en caso de los medios diferenciales.

El correcto funcionamiento del medio de cultivo se controlará con **cepas de referencia** (ver CCI-03).

- Procedimiento para el control del funcionamiento

Preparación del inóculo

a) Método semicuantitativo: es el más usado

- Para controlar las propiedades nutritivas:
Hacer una suspensión de la cepa al 0,5 Mcfarland en solución salina. Diluir de aquí al 1/100 (0.1 ml de suspensión + 9,9 ml de solución salina). Inocular el medio con 10 microlitros de esta suspensión.
- Para controlar las propiedades selectivas:
Hacer una suspensión de la cepa al 0,5 Mcfarland en solución salina. Diluir de aquí al 1/10 (0.1 ml de suspensión + 0,9 ml de solución salina). Inocular el medio con 10 microlitros de esta suspensión.
- Para controlar los medios líquidos:
Hacer una suspensión de la cepa al 0,5 Mcfarland en solución salina. Inocular el medio con 10 microlitros de esta suspensión.
- Para controlar las propiedades bioquímicas:
Hacer como en el uso con muestras clínicas.

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica CCI-SEIMC-02

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 7/22

b) Método cuantitativo: puede ser utilizado para medios que requieran más exactitud y para comparar crecimientos en distintos medios.

- El día anterior al que se va a realizar el control de calidad de los medios, preparar un cultivo del microorganismo control en BHI e incubar 18-24 horas.

- El día del control:

1°.- Sacar del frigorífico las placas de los medios de cultivo que se van a controlar y dejar a temperatura ambiente durante media hora para que pierdan humedad.

2°.- Preparar una gradilla con 6 tubos, y rotularlos -1, -2, -3, -4, -5, -6. Sacar de la estufa de CO₂ el cultivo de la cepa control y colocarlo en el primer lugar de la gradilla (Comprobar el crecimiento por la turbidez del caldo).

3°.- Con pipeta y punta estéril poner 500 µl de solución salina en cada uno de los tubos rotulados de -1 a -6.

4°.- Pasar 50 µl del cultivo de BHI de la cepa control al tubo rotulado -1. Desechar la punta de la pipeta. Homogeneizar con el Vortex.

6°.- Con una nueva punta estéril pasa 50 µl del tubo -1 al tubo -2. Desechar la punta de la pipeta. Homogeneizar con el Vortex.

7°.- Continuar haciendo diluciones, de igual forma, en los tubos -3, -4, -5, -6.

Siembra de los medios

- Medios en tubo : se inocularán con la técnica habitual utilizada en la práctica con muestras clínicas

- Medios en placa:

a) método semicuantitativo: se sembrarán con asa calibrada (10 microlitros) en estría



b) método cuantitativo (de Miles y Misra): dividir la tapa de la placa con rotulador en seis porciones y rotular cada una indicando las correspondientes diluciones: 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 10⁻¹.

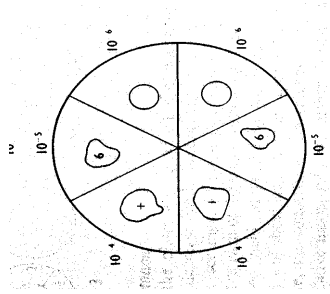
Con una pipeta y punta estéril tomar 10 µl de la dilución -6 y depositarlos en "spot" en su porción correspondiente de la placa. Con la misma punta seguir por este orden poniendo 10 µl de cada una de las diluciones, -5, -4, -3, -2 en sus correspondientes porciones de la placa de cultivo.

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica CCI-SEIMC-02

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 8/22



Tapar las placas y dejarlas sin invertir una media hora hasta que se hayan secado las gotas.

Incubación de los medios

Incubar en las condiciones de tiempo, atmósfera y T^a indicadas para cada medio/microorganismo.

Lectura e interpretación de los resultados

Para cada medio/microorganismo, observar y registrar:

- Cantidad de crecimiento: cuadrante al que llega el crecimiento en el método semicuantitativo o dilución en el método cuantitativo.
- Características de las colonias (tamaño, morfología, hemólisis etc..)
- Reacciones características en medios para identificación

Un medio es considerado que tiene un funcionamiento adecuado cuando:

- se observa en él suficiente colonias con morfología típica de todas las cepas ensayadas.
- se observa suficiente inhibición del crecimiento del microorganismo que debe ser inhibido y suficiente crecimiento del microorganismo deseado, en el caso de los medios selectivos. En el control de las propiedades nutritivas y selectivas puede ser útil comparar cantidad de crecimiento, tamaño colonial y aspecto con lotes anteriores de medios ya controlados.
- se observan las reacciones típicas y las morfologías típicas de los microorganismos ensayados en los medios diferenciales y de identificación.

NOTA: puede ser útil sembrar en paralelo una placa del lote nuevo y una placa del lote antiguo para comparar crecimientos.

d) Control de los Medios de Cultivo preparados por casas comerciales

1.- Se recomienda que provengan de empresas certificadas según ISO 9000, debiendo asegurarse el laboratorio del certificado y de que la certificación cumple todas las operaciones relevantes, incluyendo la de suministro y entrega.

2. Los lotes de medios deben estar debidamente identificados.

3.- Los fabricantes deben aportar, con cada lote suministrado, una evidencia del cumplimiento de las especificaciones de calidad que incluya:

Nº de lote

Fecha de caducidad del producto

Condiciones de conservación

Control de esterilidad y criterios de aceptabilidad

Control de crecimiento e inhibición con cepas seleccionadas para el uso del medio y criterios de aceptabilidad indicando las cepas utilizadas

Fecha de la emisión de la especificación

4. Se guardará la especificación enviada por el fabricante para cada lote de medio.

5. Comprobar las características físicas (color, precipitados, placas rotas, excesivo nº de burbujas, colonias crecidas etc...) de todos los lotes cuando se reciben.

6. Siempre que el fabricante aporte las especificaciones de calidad adecuadas, por su escasa frecuencia de fallos, el usuario no necesitan repetir el control del adecuado funcionamiento, de los siguientes medios:

Agar sangre (no selectivo)

Agar sangre colistina nalidíxico

Agar alcohol fenil etílico

Agar chocolate

Agar CIN

Agar CLED

Agar CYE/BCYE

Caldo Selenito o caldo GN

Agar Levine o Agar EMB

Agar Hektoen

Agar XLD

Agar MacConkey

Agar Manitol sal

Agar Sabouraud dextrose

Agar Salmonella- Shigella (SS)

Agar selectivos para Enterococo

Caldo BHI o TSB

Caldo Thioglycolato

Lowenstein –Jensen y Mildebrook

7.- Por la razón contraria, el usuario debe repetir el control como si fueran medios preparados en el laboratorio de:

todos los medios no citados en la lista anterior

los medios selectivos de *Neisseria spp* patógenas

los medios de *Campylobacter*

cualquier medio de los listados que demuestren alguna deficiencia en la recepción o durante su uso hasta que el problema quede resuelto.

8.- A pesar de no ser obligatorio, para sentir más confianza, el laboratorio puede decidir incluir también en el control del funcionamiento a los medios de cultivo que reciba de los citados en el

**Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-02**

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 10/22

punto 6. Según la carga de trabajo, una buena medida intermedia puede ser hacerlo solo en algunos lotes elegidos aleatoriamente.

9.- Si los medios de cultivo provienen de empresas no certificadas por la norma ISO o no cumplen con las especificaciones de calidad recomendadas, el usuario debe realizar control completo como para los medios preparados en el laboratorio de todos los lotes que se reciben.

10.- Cualquier deficiencia en el aspecto físico, esterilidad, no crecimiento de la cepa deseada, o no inhibición de la cepa no deseada, será documentada y notificada a los fabricantes para que emprendan las medidas correctoras. El laboratorio mantendrá el control de calidad de estos medios hasta que el problema quede resuelto.

Control de calidad interno de los reactivos preparados y comerciales empleados en el laboratorio

El laboratorio debe asegurarse de la idoneidad de los reactivos usados, tanto preparados en el laboratorio como comerciales, para los distintos ensayos. La verificación de los reactivos, indicación de uso y seguimiento debe estar adecuadamente documentada.

Documento técnico de utilización

Debe existir un documento o ficha que describa el reactivo, tanto para los preparados en el laboratorio como para los comerciales suministrados listos para su uso. Este documento puede contemplar cada reactivo o bien las pruebas bioquímicas para las se destina (por ejemplo: test de la catalasa en vez de peróxido de hidrógeno). Debe incluir como mínimo la siguiente información:

- Descripción: componentes y su proporción. En el caso de kits comerciales bastaría con referir los elementos que lo componen según el fabricante.
- Indicación: para que reacción o ensayo microbiológico está indicado y cual es el objetivo que se persigue.
- Controles: qué controles deben usarse y criterios de aceptabilidad.
- Plan y frecuencia de control
- Condiciones de conservación
- Limitaciones de su uso o de interpretación
- Descripción del tipo de lectura de los resultados y método de lectura

Para los reactivos, o las técnicas para los que están indicados, debe existir referencias procedentes de documentos acreditados.

Etiquetado

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

Reactivos preparados en el laboratorio

En el caso de los reactivos preparados en el laboratorio, además debe existir:

- Una ficha técnica de elaboración que incluya:
 - i. Denominación y lista de componentes, incluidos suplementos
 - ii. Caducidad y criterios de aceptabilidad
 - iii. Condiciones de conservación
 - iv. Método de esterilización
 - v. Control de esterilidad
 - vi. Controles físicos y criterios de aceptabilidad
- Un registro documentable de reactivos en los que se indique la fecha de preparación, la validación realizada y las personas responsables.

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica CCI-SEIMC-02

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 12/22

Es importante que en la elaboración de los reactivos se utilice agua destilada o desionizada y que se incluyan controles de pH dentro de los controles físicos.

Reactivos listos para su uso

Se considerarán todos los reactivos y componentes de un kit que no requieran manipulación previa a su uso. Se tendrán en cuenta los siguientes aspectos específicos de este tipo de reactivos:

1. En el caso de reactivos comerciales debe registrarse documentalmente a la llegada al laboratorio: la fecha, condiciones físicas, persona responsable de la aceptación del producto y conservación.
2. Los componentes de un kit sólo se podrán usar con otros kits del mismo número de lote, a no ser que lo especifique de otra forma el fabricante.
3. Se recomienda que exista un procedimiento en el laboratorio para el control de las especificaciones de los fabricantes en la utilización de los reactivos listos para su uso. Este control tendrá como fin detectar cambios en las instrucciones de uso entre los diferentes lotes del reactivo. El registro documentable debería incluir:
 - i. Persona responsable que realiza la revisión
 - ii. Denominación del reactivo
 - iii. Fecha de la revisión. Esta fecha deberá ser coincidir con la apertura del nuevo lote de reactivos
 - iv. Número de lote al que corresponden las instrucciones revisadas
 - v. Cambios respecto a instrucciones anteriores
 - vi. Qué medida se ha llevado a cabo frente a un determinado cambio (eventual modificación del documento técnico de utilización, notificación al personal...)

Reactivos de tinción

- a) Los procedimientos de tinción deben controlarse y registrarse los resultados con controles positivos y negativos. Debe llevarse a cabo el registro documental de los resultados de los controles, fecha y persona responsable:
 - Las tinciones especiales y fluorescentes deberían incluir un control positivo y otro negativo en cada tanda de utilización.
 - La tinción de Gram debe controlarse cada nuevo lote y una vez a la semana de uso.
- b) En la ficha técnica de elaboración deberá especificarse los volúmenes máximos aceptados de preparación, además del resto de información que se menciona en el punto 3. Los reactivos de tinción se mantienen a temperatura ambiente y están sujetos a fenómenos de evaporación, concentrando sus componentes con el paso de los días. El volumen preparado debe ir en relación con el volumen utilizado cada día.
- c) El laboratorio deberá disponer de un procedimiento documentado para asegurarse que todo el personal interpreta y registra el resultado de los exámenes microscópicos de la misma manera, especialmente si se hace de forma abreviada.

Controles aceptados

- a) Las cepas control deben ser cepas de referencia (ver CCI-03) y que sus características permitan el control de la prueba microbiológica o reactivo específico. Para la elección de un determinado microorganismo control deben seguirse las recomendaciones descritas en documentos reconocidos (ver Referencias)
- b) No es aceptable la utilización de reactivos químicos para el control de las reacciones en el lugar de cultivos bacterianos.
- c) Los controles deben efectuarse con cultivos frescos
- d) En el caso de que para el reactivo o prueba no existan controles descritos se podrá diseñar controles según las recomendaciones del CCI-03.
- e) En general será suficiente con dos microorganismos de control para cada reactivo o reacción. En la elección de los controles positivos se tendrá que tener en cuenta si la reacción a controlar produce resultados fuertemente positivos. En este caso se deberá elegir un microorganismo bien caracterizado cuyo resultado sea débilmente positivo y otro fuertemente positivo.
- f) Si se trata de preparados comerciales debe solicitarse al fabricante evidencias de que cumplen criterios de calidad. Cuando se trate de reactivos en kits comerciales de un fabricante que disponga de un sistema de calidad reconocido, el laboratorio debería verificar, en la validación inicial, que el material suministrado cumple las especificaciones establecidas con un control positivo y otro negativo.
- g) Para los reactivos listos para su uso en kits se recomienda controlar la variación de sus características a lo largo del tiempo. Para ello se podría emplear una misma muestra (o pull de muestras homogéneas) que se utilice en cada ensayo y evaluar estadísticamente los resultados, controlando si la variación de los resultados para esa muestra está dentro de un rango de ± 3 desviaciones estándar respecto a la media.

Frecuencia de control

La frecuencia de control con microorganismos de referencia va a depender de la naturaleza y estabilidad de los reactivos, así como de las características intrínsecas de la reacción. A continuación se exponen los reactivos más frecuentes empleados en un laboratorio de Microbiología y la frecuencia de control aceptable. Para el resto de reactivos deben controlarse por lo menos con cada nuevo vial o envase preparado o abierto.

**Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-02**

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 14/22

Material	Frecuencia
• Reactivos, discos y tiras:	
Catalasa	Nuevo lote o vial + cada día de uso
Oxidasa	Nuevo lote o vial + cada día de uso
Coagulasa	Nuevo lote o vial + cada día de uso
Bacitracina	Nuevo lote + una vez cada semana de uso
Optoquina	Nuevo lote + una vez cada semana de uso
ONPG	Nuevo lote + una vez cada semana de uso
Factores X, V y XV	Nuevo lote + una vez cada semana de uso
Betalactamasa (ceficinas)	Nuevo lote + cada día de uso
• Antisueros	Nuevo vial + una vez cada mes de uso
• Kits comerciales de identificación	Depende del fabricante*
• Detección de antígenos bacterianos	Nuevo lote o vial + cada día de uso
• Sondas de ADN	Nuevo lote o vial + cada día de uso

* Si son proporcionados por fabricantes que siguen sistemas de calidad se recomienda al menos en la validación inicial

Resumen de las recomendaciones

- El laboratorio debe elaborar procedimientos documentados para la preparación y control de medios de cultivo y reactivos.
- El control de calidad de los medios y reactivos debe abarcar todo el proceso de preparación
- El control de calidad de medios de cultivo y reactivos será supervisado por un especialista en Microbiología
- El control de los medios preparados en el laboratorio debe incluir controles de esterilidad y funcionamiento adecuado
- Debe exigirse a las casas comerciales especificaciones sobre el cumplimiento de controles de calidad de los medios y reactivos suministrados
- Para algunos medios preparados listos para su uso por casas comerciales, el usuario debe repetir el control de calidad para comprobar su correcto funcionamiento
- El control de los reactivos del laboratorio deberá incluir la elaboración, recepción, conservación y funcionamiento con las adecuadas cepas de referencia
- Se recomienda controlar la homogeneidad de los reactivos en *k/it* dentro del mismo lote, así como las posibles modificaciones de las instrucciones del fabricante entre los diferentes lotes.

Referencias

Guía para la acreditación de los laboratorios que realizan análisis microbiológicos. G-ENAC-04. Rev. 3. Noviembre 2002.

Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media. Second edition 1990; Approved standard. M22- A2. NCCLS.

MacFaddin J. F. 1985. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. 3rd edition; Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

MacFaddin J. F. 2000. Biochemical Tests for identification of Medical Bacteria. 3rd edition; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

Miller J. M. Quality control of Media, Reagents, and Stains. In Balows A., Hausler W. J., Herrmann K. L., Isenberg H. D., and Shadomy H. J. (ed.). 1991. Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. ASM, Washington, D. C. págs. 1203-1225.

Isenberg HD (ed). 1998. Essential procedures for clinical microbiology. ASM Press. Washington, D. C.

August M. J., Hindler J. A., Huber T. W., and Sewell D. L. Cumitech 3A. Quality Control and Quality Assurance Practices in clinical Microbiology. 1990. Coordinating ed., Weissfeld A. L. ASM Press. Washington D. C.

Anexo 1. Listado de cepas para control de algunos Medios de Cultivo más comunes

MEDIOS	MICROORGANISMOS	RESULTADOS ESPERADOS
Agar Sangre	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Streptococcus pyogenes</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Crecimiento, alfa hemólisis</p> <p>Crecimiento, beta hemólisis</p> <p>Crecimiento</p> <p>Crecimiento</p>
Agar Sangre anaerobios (CDC) y sangre lacada no selectivo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacteroides fragilis</i> • <i>Fusobacterium nucleatum</i> • <i>Clostridium perfringens</i> • <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 	<p>Crecimiento</p> <p>Crecimiento</p> <p>Crecimiento, Beta hemólisis</p> <p>Crecimiento</p>
Agar sangre lacada Gentamicina+vancomicina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium perfringens</i> • <i>Bacteroides fragilis</i> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> 	<p>Inhibición</p> <p>Crecimiento</p> <p>Inhibición</p> <p>Inhibición</p>
Agar sangre colistina nalidixico (CNA)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pyogenes</i> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Proteus mirabilis</i> 	<p>Crecimiento, beta hemólisis</p> <p>Crecimiento, alfa hemólisis</p> <p>Crecimiento</p> <p>Inhibición</p>
Agar Chocolate	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Neisseria gonorrhoea</i> • <i>Haemophilus influenzae</i> 	<p>Crecimiento</p> <p>Crecimiento</p>
Agar MacConkey	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Proteus mirabilis</i> • <i>Salmonella Typhimurium</i> 	<p>Crecimiento, colonias rosas</p> <p>Crecimiento, colonias incoloras (poco velo)</p> <p>Crecimiento, colonias incoloras</p>
Agar MaConkey sorbitol	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>E. coli</i> O157:H7 • <i>Enterococcus faecalis</i> 	<p>Colonias rosas</p> <p>Colonias incoloras</p> <p>Inhibición</p>
Agar de aislamiento para <i>Haemophilus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Haemophilus influenzae</i> 	<p>No crecimiento</p> <p>Crecimiento</p>
Agar <i>Campylobacter</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter jejuni</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Crecimiento</p> <p>No crecimiento</p>

**Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-02**

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 18/22

MEDIOS	MICROORGANISMOS	RESULTADOS ESPERADOS
Agar Thayer-Martin o NYC	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Neisseria gonorrhoeae</i> • <i>Neisseria meningitidis</i> • <i>Neisseria sicca</i> • <i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Candida albicans</i> 	<p>Crecimiento</p> <p>Crecimiento</p> <p>Inhibición</p> <p>Inhibición</p> <p>Inhibición</p>
Agar manitol	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus epidermidis</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Proteus mirabilis</i> 	<p>Colonias rojas a 48h</p> <p>Colonias amarillas a 48h</p> <p>Inhibición</p>
Agar Cled	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> 	<p>Crecimiento</p> <p>Crecimiento</p>
TCBS	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Vibrio alginolyticus</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Color amarillo</p> <p>No crecimiento</p>
Medio <i>Salmonella-Shigella</i>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella enterica</i> • <i>Shigella flexneri</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Crecimiento, colonias incoloras, con/sin precipitado negro</p> <p>Crecimiento, colonias incoloras</p> <p>Inhibición</p> <p>Inhibición parcial</p>
Agar Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella enterica</i> • <i>Shigella flexneri</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Crecimiento, colonias verdes con precipitado negro</p> <p>Crecimiento, colonias verdes</p> <p>Inhibición parcial, colonias amarillas</p> <p>Inhibición parcial, colonias amarillas o salmón</p>
Agar XLD	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella enterica</i> • <i>Shigella flexneri</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Crecimiento, colonias rojas con precipitado negro</p> <p>Colonias rojas</p> <p>Inhibición parcial</p> <p>Inhibición parcial, colonias amarillas</p>

**Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-02**

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 19/22

MEDIOS	MICROORGANISMOS	RESULTADOS ESPERADOS
Medio BCYE- α	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Legionella pneumophila</i> • <i>Legionella bozemanii</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Crecimiento</p> <p>Crecimiento</p> <p>Inhibición</p> <p>Inhibición</p>
BHI caldo o TSB	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> 	<p>Crecimiento</p> <p>Crecimiento</p>
Caldo Selenito	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella enterica</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Crecimiento</p> <p>No crecimiento</p>
Thioglicolato	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacteroides fragilis</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Bacteroides vulgatus</i> • <i>Clostridium perfringens</i> 	<p>Crecimiento en 24 h</p> <p>Crecimiento en 24 h</p> <p>Crecimiento en 24 h</p> <p>Crecimiento en 24 h</p>
Arginina dehidrolasa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter cloacae</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> 	<p>Color púrpura</p> <p>Color amarillo</p>
Lisina decarboxilasa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> • <i>Enterobacter cloacae</i> 	<p>Color púrpura</p> <p>Color amarillo</p>
Ornitina decarboxilasa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter cloacae</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> 	<p>Color púrpura</p> <p>Color amarillo</p>
Citrato de Simmons	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Color azul</p> <p>Color verde</p>
Fenilalaninadeaminasa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Proteus mirabilis</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Verde tras añadir cloruro férrico</p> <p>No verde tras añadir cloruro férrico</p>
Agar bilis-esulina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus faecalis</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<p>Colonias negras</p> <p>Inhibición</p>

**Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-02**

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 20/22

MEDIOS	MICROORGANISMOS	RESULTADOS ESPERADOS
Medio DNAsa	<ul style="list-style-type: none">• <i>Serratia marcescens</i>• <i>Staphylococcus aureus</i>	Halo o aclaramiento Halo o aclaramiento
Urea caldo o agar	<ul style="list-style-type: none">• <i>Proteus mirabilis</i>• <i>Escherichia coli</i>	Viraje a rosa Sin cambio de color
Agar Kligler o TSI	<ul style="list-style-type: none">• <i>Salmonella enterica</i>• <i>Escherichia coli</i>• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pico alcalino, fondo ácido, SH2 (+), gas (+-) Pico y fondo ácido, SH2(-), gas Pico y fondo alcalino, SH2 (-), gas (-)

Anexo 2. Listado de cepas para control de los reactivos más comunes

Reactivo	Cepa	Reacciones esperadas
Bacitracina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pyogenes</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> 	sensible: cualquier halo de inhibición a las 24 h resistente: sin halo de inhibición a las 24 h
Bilis, solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> 	Soluble: desaparición de la colonia Insoluble: colonia íntegra
CAMP reacción	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Streptococcus pyogenes</i> 	Positivo: punta de flecha con hemólisis más intensa Negativo: la hemólisis no se incrementa
Catalasa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Streptococcus agalactiae</i> 	Positivo: Desprendimiento inmediato de burbujas bien visibles Negativo: Sin burbujas
Coagulasa	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Staphylococcus epidermidis</i> 	Positivo: formación de coágulo en 4 h Negativo: no formación de coágulo tras 4 horas
betahemolíticos estreptococos, seroagrupación	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pyogenes</i> • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Streptococcus dysagalactiae</i> subs. <i>equisimilis</i> C • <i>Enterococcus faecalis</i> • <i>Streptococcus dysagalactiae</i> subs. <i>equisimilis</i> G 	Aglutinación con grupo A y no con los demás Aglutinación con grupo B y no con los demás Aglutinación con grupo C y no con los demás Aglutinación con grupo D y no con los demás Aglutinación con grupo G y no con los demás
Factores X, V y XV	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Haemophilus influenzae</i> 	Crecimiento alrededor del XV a las 24 h, crecimiento entre X y V a las 24 h
Haemophilus, seroagrupación	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. influenzae</i> tipo B 	Aglutinación visible en suero anti-tipo B y no con los demás
Hipurato	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter jejuni</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> 	Positivo: azul púrpura Negativo: sin cambio de color o amarillo

**Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-02**

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 22/22

Reactivo	Cepa	Reacciones esperadas
Indol	<ul style="list-style-type: none">• <i>Escherichia coli</i>• <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo: un anillo rojo en la superficie de la capa alcólica Negativo: no se produce color en el anillo alcólico
Indol rápido	<ul style="list-style-type: none">• <i>Escherichia coli</i>• <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positivo: azul verdoso Negativo: sin cambio de color tras 2 min
Indoxylacetato	<ul style="list-style-type: none">• <i>Campylobacter jejuni</i>• <i>Campylobacter lari</i>	Positivo: azulverdoso Negativo: azul pálido.
ONPG	<ul style="list-style-type: none">• <i>Escherichia coli</i>• <i>Proteus mirabilis</i>	Positivo: color amarillo Negativo: sin cambio de color
Optoquina	<ul style="list-style-type: none">• <i>Streptococcus pneumoniae</i>• <i>Streptococcus mitis</i>	Sensible: ≥ 14 mm Resistente: 6 mm
Oxidasa	<ul style="list-style-type: none">• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>• <i>Escherichia coli</i>	Positivo: color púrpura en 30 s. Negativo: sin cambio de color.
PYR	<ul style="list-style-type: none">• <i>Enterococcus faecalis</i>• <i>Streptococcus agalactiae</i>	Positivo: rosa o naranja-rojo Negativo: sin cambio de color o ambar.

CCI-SEIMC-03

Recomendaciones para el control de calidad interno de cepas y material de referencia

Consuelo Miranda¹ y Lorena López Cerero²

¹ Consuelo Miranda
S. Microbiología. H. Virgen de las Nieves. Granada
Tlf. 95-8020119
consuelo.miranda.sspa@juntadeandalucia.es

² Lorena López
Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Avd Dr. Fedriani s/n.
Sevilla. 41009. Teléfono 955 008138. Correo electrónico: lorenalc@terra.es

El presente documento se distribuye como copia no controlada

Índice

Índice	2
Objeto	3
Alcance	3
Personal	3
Condiciones ambientales	3
Condiciones de bioseguridad	3
Programa de limpieza	3
Manuales de Procedimientos	3
Control de calidad interno de las cepas de referencia	4
Obtención de las cepas de referencia	4
Mantenimiento y uso de las cepas de referencia	4
Control de calidad interno de material de referencia	6
Obtención de materiales de referencia microbiológicos	6
Mantenimiento del material de referencia	6
Resumen de recomendaciones	6
Referencias	6
Anexo I. Lista de Instituciones de los cuales se pueden obtener las cepas de referencia	7

Objeto

Los programas de control de calidad aseguran que la información generada por el laboratorio es exacta, adecuada, trazable y reproducible. El objeto de las presentes recomendaciones es describir los procedimientos que hay que seguir para conseguir, conservar y controlar cepas y material de referencia para los distintos ensayos microbiológicos.

Alcance

Implica a todas las cepas microbiológicas y al material (muestras para extensiones en portaobjetos y sueros humanos) que van a ser utilizados como material de referencia en los controles de ensayos microbiológicos.

Personal

Los análisis deben ser realizados por personal técnico cualificado con experiencia en Microbiología. La supervisión de los análisis y la interpretación de los resultados debe ser realizada por un titulado superior con la especialidad de Microbiología Clínica.

Como norma general es conveniente seguir estos principios:

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

Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales requeridas para desarrollar los ensayos relacionados con el control de cepas y material de referencia son similares a las de cualquier laboratorio de Microbiología.

Condiciones de bioseguridad

La inmensa mayoría de las cepas de referencia están clasificados dentro del grupo de riesgo 1 y 2. No obstante, algunas especies, especialmente dentro de Micología (ver CCI-07), Micobacteriología (ver CCI-06) y Virología (ver CCI-09), requieren unas condiciones de bioseguridad de nivel 3. Por tanto, todo laboratorio de Microbiología debe disponer de un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad si maneja este tipo de microorganismos.

Programa de limpieza

El programa de limpieza es similar al del laboratorio general de Microbiología.

Manuales de Procedimientos

- Cualquier técnica realizada en el laboratorio debe tener su manual de procedimiento que tiene que estar disponible de forma permanente para todo el personal.

- Debe existir un procedimiento normalizado específico para el procesamiento de cepas de referencia y de trabajo, así como para los materiales de referencia.
- Los procedimientos tienen que ser revisados anualmente por el Director del laboratorio.
- Las modificaciones de los procedimientos o la inclusión de nuevos protocolos tienen que ser autorizados por el Director de Laboratorio.

Control de calidad interno de las cepas de referencia

Las cepas de referencia son necesarias para la verificación y validación de los medios y reactivos, así como para la validación y evaluación de métodos microbiológicos.

Obtención de las cepas de referencia

Debe existir un registro documentable del origen de las cepas de referencia y la forma de obtención. Para demostrar la trazabilidad, los laboratorios deben usar cepas de referencia obtenidas de la siguiente manera:

- 1) Preferiblemente de forma directa a partir de una colección nacional o internacional reconocida (ver Anexo I Lista de Instituciones). Debe registrarse y conservarse el certificado de trazabilidad de la colección.
- 2) Alternativamente:
 - de forma directa a partir de las cepas distribuidas por el Programa de Control de Calidad de la SEIMC. Si estas cepas van a ser utilizadas posteriormente como cepas de referencia, una vez recepcionadas en el laboratorio, deberán ser reconstituidas y procesadas como tales y ser subcultivadas una sola vez para obtener las cepas de reserva.
 - En ocasiones no existen cepas con las características requeridas que se puedan obtener por los procedimientos antes comentados. Excepcionalmente se pueden utilizar aislamientos clínicos que hayan sido verificadas sus características por al menos 3 laboratorios de Microbiología Clínica de Hospitales terciarios. Estas cepas deben seguir el mismo proceso de subcultivo de una cepa de referencia en el laboratorio de origen y serán válidas únicamente en ese laboratorio.

Mantenimiento y uso de las cepas de referencia

Debe existir un registro documentable de la recepción de las cepas de referencia, en el que se anote la fecha de llegada, condiciones de llegada, controles realizados, método de conservación y número de viales y personal responsable. **Las cepas de referencia** se reconstituirán y someterán a los controles de pureza y ensayos bioquímicos que sean necesarios. Serán subcultivadas en los medios apropiados una sola vez para obtener las **cepas de reserva y las cepas de trabajo**.

Las cepas de reserva deben conservarse utilizando, una técnica que mantenga las características deseadas de las cepas de referencia, como por ejemplo, liofilización, ultracongelación (-70° C), conservación en nitrógeno líquido, etc.

En un medio adecuado para la congelación (por ej: Tryptic Soy Broth con glicerol 10-15% v/v) pueden mantenerse indefinidamente a -70° C y 1 año entre -50° C y -70°C. Nunca mantener congeladas por encima de -50° C.

Todos los viales deben ser identificados con la cepa, procedencia y fecha de congelación.

Cuando se descongelan las cepas de reserva no deben volverse a congelar y reutilizar. Por eso deben congelarse suficiente nº de viales de cada cepa, para poder disponer de cepas de trabajo durante como mínimo 1 año. Una alternativa podrían ser los viales comerciales para congelación de

cepas mediante perlas adherentes, que permiten utilizar una perla para subcultivo sin descongelar el vial.

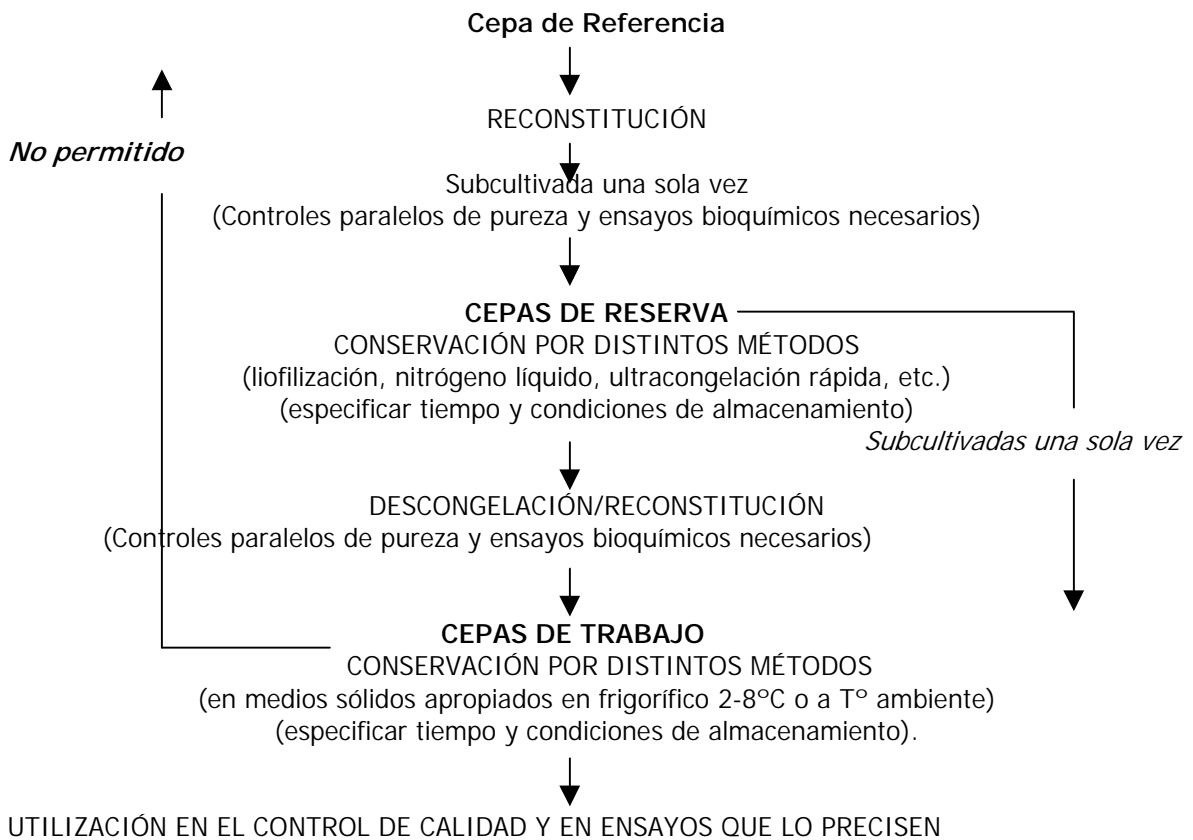
Las cepas de trabajo se obtienen por subcultivo de las cepas de reserva en medios sólidos apropiados para cada microorganismo (CTA, AS, ACH...). Estas cepas se conservarán en refrigeración 2-8°C o a Tª ambiente durante un período de tiempo que asegure la viabilidad del microorganismo, no más de un mes. Siempre se verificará la pureza y la morfología típica colonial del subcultivo.

En general, las cepas bacterianas de trabajo no deben ser subcultivadas, sin embargo, pueden ser subcultivadas hasta un número determinado de veces (máximo 3) cuando:

- el laboratorio pueda aportar evidencias documentadas que demuestren que no se ha producido pérdida de viabilidad (cuando sea importante), cambios en la actividad bioquímica y/o cambios en la morfología.
- Así lo requieran los métodos normalizados

Las cepas de trabajo no deben ser subcultivadas para sustituir a las cepas de reserva.

Esquema de Utilización de Cepas de Referencia



Todas las fases del proceso han de estar perfectamente documentadas y debe mantenerse un registro detallado de todas las operaciones realizadas.

Control de calidad interno de material de referencia

Los materiales de referencia, como secuencias genéticas y sueros, proporcionan trazabilidad en determinados ensayos microbiológicos y son utilizados para demostrar la precisión de los resultados, calibrar equipos, validar métodos y permitir la comparación de métodos al ser utilizados como patrones de referencia.

Obtención de materiales de referencia microbiológicos

Debe existir un registro documentable del origen del material, características y forma de obtención. Para demostrar la trazabilidad, los laboratorios deben usar material de referencia obtenido de la siguiente manera:

- 3) Preferiblemente de forma directa a partir de una colección nacional o internacional reconocida (ver Anexo I Colecciones reconocidas). Debe registrarse y conservarse el certificado de trazabilidad de la colección.
- 4) Alternativamente de forma directa a partir de material distribuido por el Programa de Control de Calidad de la SEIMC.

Mantenimiento del material de referencia

Las sustancias de referencia deben almacenarse y manipularse en unas condiciones que no alteren su integridad, de acuerdo con un procedimiento documentado y el método de ensayo correspondiente.

Debe existir un registro documentable de la recepción del material de referencia, en el que se anote la fecha de llegada, condiciones de llegada, controles realizados, método de conservación y número de viales y personal responsable. En general debería distribuirse en alícuotas de trabajo ya lista para usar y conservarlas a la temperatura definida hasta su uso.

Resumen de recomendaciones

Referencias

Anexo I. Lista de Instituciones de los cuales se pueden obtener las cepas de referencia

Institución	Dirección
1. Colección española de cultivos tipos (CECT)	Laboratorio de microbiología de la facultad de Biología de la Universidad de Valencia Avda. de la Moreras, s/n. Burjasot. (Valencia) www.uv.es/cect/
2. National Collection of Type Cultures (NCTC) (Bacterias, bacteriófagos, micoplasmas, plásmidos)	Central Public Health Laboratory 61 Colindale Avenue, London NW9 5HT. UK http://cphl.phls.org.uk/divisions/cdmssd/nctc
3. Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)	Institut Pasteur 25 Rue du Docteur Roux 75724 Paris Cedex 15. France www.pasteur.fr/recherche/unites/Cncm
4. Culture Collection, University of Göteborg (CCUG) (cepas tipo y secuencias 16 S ARNr)	Department of Clinical Bacteriology University of Göteborg, Mikrobiologen Guldhelsgatan 10, SE-413 46 Göteborg, Sweden www.ccug.gu.se
5. National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF) (Hongos patógenos)	Public Health Laboratory Mycological Referente Laboratory Myrtle Road, Kingsdown, Bristol BS2 8EL. UK www.ukncc.co.uk
6. CAB International Mycological Institute (CMICC) (Hongos aislados, distintos a patógenos humanos y animales y, levaduras)	International Mycological Institute Bakeham lane Englefield Green, Egham, Surrey, TW20 9TY. UK
7. National Collection of Yeast Cultures (NCYC) (Levaduras distintas a las patógenas conocidas)	Institute of Food Research Norwick Research Park Colney Lane, Norwich, Norfolk NR4 7 UA. UK www.ifr.bbsrc.ac.uk/ncyc
8. National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd. (NCIMB) (Bacterias no patógenas, actinomicetos y plásmidos)	AURIS Business center 23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY. UK https://home.bt-webworld.com/ncimb
10. Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) (Hongos Marinos)	SAMS Research Services Ltd. Dunstaffnage Marine Laboratory PO Box, 3 OBAN, Argyll PA34 4AD, Scotland. www.ife.ac.uk/ccap

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-03

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 8/8

12. European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)
(Células animales) PHLS.
Health Protection Agency
Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG. UK
www.ecacc.org.uk
14. Central Bureau Voor Schimmelcultures (CBS)
(Hongos, actinomicetos) PO Box 273, Oosterstraat 1, NL-3740 AG
Baarn, Netherlands.
15. American Type Culture Collection (ATCC) 12301 Parklawn Drive, Rockville MD 20852,
USA
En España: LGC Promochem
Peru, 104 Nave 3
08018 Barcelona
www.atcc.org
16. Microbial Strain Data Network Institute of Biotechnology
Cambridge University, 307, Huntingdon Road,
Cambridge CB3 0JX, UK
17. Centre de Collection du Type Microbien (CCTM) Institut Universitaire de Microbiologie
CHUV, Rue de Bugnon 44, CH-1011
Lausanne, Switzerland

CCI-SEIMC-04

RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN EQUIPOS DE USO GENERAL EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Consuelo Miranda

S. Microbiología. H. Virgen de las Nieves. Granada

Tif. 95-8020119

consuelo.miranda.sspa@juntadeandalucia.es

Amparo Farga

Unidad de Microbiología. Hospital Arnau de Vilanova. Valencia. Teléfono 96 3868504. E-mail:

afarga@gva.es

Ana Lloret

Unidad de Microbiología. Hospital Arnau de Vilanova. Valencia. Teléfono 96 3868504. E-mail:

lloret_ana@gva.es

Lorena López

Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Avd Dr. Fedriani s/n.
Sevilla. 41009. Teléfono 955 008138. Correo electrónico: lorenalc@terra.es

INDICE

1. Objeto
2. Alcance
3. Personal
4. Manual de procedimientos
5. Calibración de equipos
6. Verificación de equipos
7. Mantenimiento
8. Bibliografía
9. Anexo1 Directrices para la calibración y controles de calibración
10. Anexo2 Directrices para la validación y verificación de equipos
11. Anexo3 Directrices para el mantenimiento de equipos

1. OBJETO

El objeto de este procedimiento es recoger las recomendaciones respecto al control interno de calidad de los equipos de uso general en el Laboratorio de Microbiología

1. ALCANCE

Como parte de su sistema de calidad, el laboratorio debe documentar e implantar un programa de mantenimiento, calibración y verificación del funcionamiento de sus equipos

2. PERSONAL

El control de calidad de equipos debe ser realizado por personal técnico cualificado debidamente formado. Los procedimientos de control de calidad serán dirigidos y controlados por un especialista en Microbiología.

3. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

La implantación de dicho sistema de control interno requiere inicialmente establecer:

- Inventario actualizado de todos los equipos del laboratorio
- Identificación única para cada equipo, así como del estado de calibración del mismo
- Registro o ficha de cada equipo con la siguiente información
 - Nombre del equipo
 - Código de identificación
 - Fabricante y número de serie
 - Fecha de adquisición y de puesta en servicio
 - Estado a su adquisición
 - Ubicación
 - Procedimientos de mantenimiento y calibración, indicando las actividades a realizar y su periodicidad
 - Programa de verificación de su funcionamiento
 - Medidas de protección personal en cuanto a su manejo
 - Registro de todas las actividades realizadas

5. CALIBRACION

- Deben calibrarse aquellos equipos que tengan un efecto directo sobre los resultados de una prueba
- La calibración de estos equipos debe ser trazable a patrones nacionales o internacionales
- Deben obtenerse y conservarse los certificados de calibración externa en los que deben constar los resultados de las medidas realizadas y las incertidumbres asociadas a las mismas
- En el anexo 1 se recogen las recomendaciones de ENAC en cuanto a los requisitos y periodicidad de las calibraciones a efectuar en el Laboratorio de Microbiología

6. VERIFICACION Y VALIDACION

- Las características registradas en la validación inicial de los equipos debe verificarse y registrarse periódicamente y después de cualquier reparación o modificación importante
- Deben especificarse para cada equipo los rangos de tolerancia admitidos, comunicándose las desviaciones observadas al responsable par las correspondientes acciones correctoras
- En el Anexo 2 se recogen las directrices para la validación y verificación de equipos según el documento G-ENAC-04

7. MANTENIMIENTO

- Deben especificarse los intervalos de mantenimiento dependiendo del tipo de equipos así como de la frecuencia de uso
- El mantenimiento de los equipos generales de laboratorio consiste básicamente en la limpieza, inspección de daños, verificación y si procede esterilización
- Deben establecerse y conservarse los registros del mantenimiento efectuado en los que conste la actividad realizada, cuando y quien la ha efectuado.
- En el anexo 3 se recogen las recomendaciones de ENAC al respecto

8. BIBLIOGRAFÍA

- Norma ISO 7218 (directrices sobre el mantenimiento de equipos)
- Guía G-ENAC-04. Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos
- Procedimientos en microbiología clínica (SEIMC) nº 10 Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica

8. ANEXO 1

DIRECTRICES PARA LA CALIBRACIÓN Y LOS CONTROLES DE CALIBRACIÓN

Termómetros de referencia (columna líquida)	Recalibrado plenamente trazable: Cada 5 años Punto único(p. ej., punto de congelación): Anualmente
Balanzas	Calibración plenamente trazable: Anualmente
Pesas de calibración	Calibración plenamente trazable: Cada 5 años
Pesa(s) de control	Verificar frente a pesa calibrada o verificar en la balanza inmediatamente después de la calibración trazable: Anualmente
Material volumétrico de cristal	Calibración gravimétrica a la tolerancia Requerida: Anualmente
Microscopios	Calibración trazable del micrómetro del portaobjetos (cuando sea necesario) Inicialmente
Centrifugas	Calibración trazable o verificar frente a tacómetro independiente, según sea necesario: Anualmente

9. ANEXO 2.- DIRECTRICES PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE EQUIPOS

<i>Tipo de aparato</i>	<i>Requisito</i>	<i>Frecuencia</i>
Aparatos con temperatura controlada (incubadores, baños, refrigeradores, congeladores)	(a) Verificar la estabilidad y uniformidad de la temperatura	(a) Inicialmente, cada 2 años y después de una reparación/modificación
	(b) Verificar la temperatura	(b) Diariamente/con cada uso
Estufas de esterilización	(a) Verificar la estabilidad/uniformidad de la temperatura	(a) Inicialmente, cada 2 años y después de una reparación/modificación
	(b) Verificar la temperatura	(b) Diariamente/con cada uso
Autoclaves	(a) Verificar las características para cargas/ciclos	(a) Inicialmente, cada 2 años y después de una reparación/modificación
	(b) Verificar la temperatura/tiempo	(b) Con cada uso
Cabinas de seguridad	(a) Verificar las características técnicas	(a) Inicialmente, todos los años y después de una reparación/modificación
	(b) Control microbiológico	(b) Semanalmente
	(c) Verificar la velocidad del aire	(c) Con cada uso
Cabinas de flujo laminar	(a) Verificar las características técnicas	(a) Inicialmente, y después de una reparación /modificación
	(b) Verificar la esterilidad	(b) Semanalmente

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-04

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 7/10

Cronómetros	Verificar frente a señal horaria nacional	Anualmente
Microscopios	Verificar alineación Diariamente/con cada uso	
pH metros	Ajustar utilizando como mínimo dos	tampones de la calidad adecuada Diariamente/con cada uso
Balanzas	Ajustar el cero y verificar con la pesa de control	Diariamente/con cada uso
Desionizadores y unidades de ósmosis inversa	(a) Verificar la conductividad (b) Verificar la contaminación microbiana	(b) Semanalmente (b) Mensualmente
Distribuidores de medios	Verificar el volumen distribuido	Con cada ajuste o reposición
Pipetas automáticas precisión del volumen distribuido	Verificar la exactitud y naturaleza del uso	Según la frecuencia y
Contadores automáticos de colonias	Verificar frente al recuento manual	Anualmente
Centrifugas	Verificar velocidad frente a tacómetro calibrado e independiente	Anualmente
Jarras de anaerobiosis/incubadores	Verificar frente a indicador de anaerobiosis	Con cada uso
Condiciones ambientales del laboratorio	Vigilar la contaminación microbiana del aire y las superficies	Semanalmente

10. ANEXO 3.-

DIRECTRICES PARA EL MANTENIMIENTO DE LOS EQUIPOS

<i>Tipo de aparato</i>	<i>Requisito</i>	<i>Frecuencia sugerida</i>
(a) Incubadores (b) Refrigeradores (c) Congeladores, estufas	Limpiar y desinfectar las Superficies internas	(a) Mensualmente (b) Según sea necesario (p. ej., cada 3 meses) (c) Según sea necesario (p. ej., anualmente)
Baños maría Vaciar, limpiar, desinfectar	y rellenar Mensualmente, o cada 6 meses	si se utiliza un biocida
Centrifugas	(a) Revisar (b) Limpiar y desinfectar	(a) Anualmente (b) Con cada uso
Autoclaves	(a) Verificar visualmente la junta, limpiar y drenar la cámara (b) Revisión completa (c) Control de seguridad del vaso de presión	(a) Periódicamente, según las recomendaciones del fabricante (b) Anualmente o según las recomendaciones del fabricante (c) Anualmente
Cabinas de seguridad Cabinas de flujo laminar Revisión completa y	comprobación mecánica Anualmente o según las	recomendaciones del fabricante
Microscopios	Revisión completa de mantenimiento	Anualmente
PH - metros	Limpiar electrodos	Con cada uso
Balanzas, diluidores gravimétricos	(a) Limpiar (b) Revisar	(a) Con cada uso (b) Anualmente

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-04

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 9/10

Destiladores	Limpiar y desincrustar	Según sea necesario (p. ej., cada 3 meses)
Desionizadores, Unidades de ósmosis inversa	Sustituir cartucho y membrana	Según las recomendaciones del fabricante
Jarras de anaerobiosis	Limpiar y desinfectar	Después de cada uso
Distribuidores de medios, material volumétrico, pipetas, material de uso general	Descontaminar, limpiar y esterilizar cuando sea apropiado	Con cada uso
Sembradores en espiral		

(a) Anualmente

(b) Con cada uso

Laboratorio

- (a) Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo
- (b) Limpiar suelos, desinfectar desagües y pilas
- (c) Limpiar y desinfectar otras superficies

CCI-SEIMC-05

RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS Y DETERMINACIÓN DE NIVELES DE ANTIMICROBIANOS EN FLUIDOS ORGÁNICOS

Emilia Cercenado Mansilla

Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Dr Esquerdo
46, 28007. Madrid. Tel. 91-586-8459; FAX: 91-504-4906; e-mail: ecercenado@teleline.es

Este documento se distribuye como copia no controlada

Documento de control de calidad interno para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos por el método de difusión con discos

1. Objetivo

Los objetivos de un programa de control de calidad para el método de difusión con discos son: monitorizar la precisión y exactitud del procedimiento, el funcionamiento de los reactivos (medios y discos), y el modo de proceder de las personas que realizan la prueba, la leen, la interpretan e informan los resultados. Para alcanzar estos objetivos se utilizan cepas control que se seleccionan en base a su estabilidad genética y su utilidad para validar esta prueba.

2. Fundamento

Utilizando este método se determina la sensibilidad, resistencia, o sensibilidad disminuida de un microorganismo en cultivo puro a diferentes antimicrobianos. Para ello se utilizan discos de papel de filtro (generalmente comercializados) impregnados con una solución normalizada del antimicrobiano que se disponen sobre la superficie de un medio de cultivo sólido previamente inoculado en su superficie con una suspensión bacteriana. El diámetro de inhibición que se produce está en relación con el grado de sensibilidad o resistencia del microorganismo a la acción del antimicrobiano.

El medio de cultivo donde se realice el antibiograma debe ser estándar (generalmente Mueller-Hinton agar) y el inóculo debe estar asimismo estandarizado.

3. Cepas de referencia

Las cepas de referencia recomendadas por el NCCLS para controlar la precisión y exactitud del procedimiento de difusión con discos cuando se determina la sensibilidad de bacterias no fastidiosas son: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 35218. Esta última cepa solamente se utiliza como control de las combinaciones de beta-lactámico con inhibidor de beta-lactamasas, como ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. *E. faecalis* ATCC 29212 se utiliza para monitorizar los niveles de inhibidores de trimetoprim o sulfamidas en agar Mueller-Hinton, así como para controlar los discos que contienen altas concentraciones de gentamicina o estreptomycin.

Las cepas de referencia se deben obtener de una fuente fiable, y deben mantenerse cultivos stock de las mismas de forma que se asegure su viabilidad y que se evite en lo posible la selección de mutantes resistentes.

4. Periodicidad

Obligatoriamente cada nuevo lote de agar Mueller-Hinton se debe probar con las cepas de referencia anteriormente indicadas antes de utilizarse y también se debe probar cada nuevo lote de discos que se vayan a utilizar.

Es recomendable la utilización de las cepas de referencia cada vez que se realice una prueba de difusión con discos con aislados clínicos. Esta frecuencia se puede reducir si los resultados son satisfactorios durante 30 días seguidos, considerando satisfactorio el que no más de 3 de cada 30 diámetros de inhibición estén fuera de los límites aceptados por el NCCLS. En este momento es suficiente utilizar las cepas ATCC una vez por semana o cada vez que alguno de los medios cambie.

Si un diámetro de halo está fuera de los límites permitidos, se debe realizar una acción correctora, como puede ser la repetición diaria de las pruebas con cepas ATCC.

5. Medios de cultivo, Reactivos y Productos

- Discos de antimicrobianos (diferentes casas comerciales)
- Tubos con agua estéril o caldo de cultivo
- Placas de agar Mueller-Hinton
- Placas de agar Mueller-Hinton con 5% sangre (en su caso)
- Placas de agar Mueller-Hinton chocolate (en su caso)
- Placas de agar HTM (*Haemophilus* Test Medium) (en su caso)
- Escala de MacFarland (tubos con diferentes concentraciones de sulfato de bario)

Localización: los discos de antimicrobianos y las placas con los medios de cultivo se deben guardar en nevera. La escala de MacFarland debe guardarse a temperatura ambiente.

6. Procedimiento

Los cultivos de cepas ATCC que se vayan a utilizar deben ser recientes (18-24 h) y estar crecidos en medio de agar sangre. Los antimicrobianos a ensayar frente a cada microorganismo están indicados en el anexo I, aunque puede haber variaciones en cuanto a antimicrobianos a ensayar en los diferentes laboratorios. Siempre que se utilice un nuevo antimicrobiano debe ensayarse con las cepas de referencia.

Aparatos y material necesario:

- Torundas de algodón estériles
- Dispensadores multidiscos o pinzas
- Escala de McFarland

1. Rotular un tubo de agua destilada por cada cepa ATCC.
2. Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de agua destilada con varias colonias del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland. Agitar con un agitador Vortex (alternativamente se pueden utilizar para el inóculo microorganismos crecidos en un caldo de cultivo que posteriormente se debe ajustar al 0,5 de la escala de McFarland).
3. Impregnar la torunda de algodón con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones rotándola 3 veces.
4. Utilizando el dispensador multi-discos o unas pinzas previamente flameadas y frías colocar los discos de los diferentes antimicrobianos sobre la placa antes de 15 minutos desde que se inoculó la placa con la suspensión bacteriana.
5. Incubar en estufa a 37°C (antes de 15 minutos desde que se aplicaron los discos), durante 18-24 horas. En el caso de estafilococos y estreptococos la incubación debe ser de 24 horas completas.
6. Una vez realizada la determinación, las cepas ATCC se guardarán en nevera a 4°-8°C.

7. Obtención de resultados y criterios de aceptación y rechazo

1. Medir con una regla los halos de inhibición y anotar los resultados (en mm) en una hoja de registro correspondiente.
2. Rangos aceptables: los resultados de los halos de inhibición para cada combinación de antimicrobiano/cepa ATCC se indican en el documento vigente del NCCLS, que en el momento actual es el M100-S14. Vol.24 No. 1. Enero 2004.
3. Criterios de aceptación y rechazo: no se aceptará ningún lote de medios o discos si los halos de inhibición de las cepas ATCC no están dentro de los márgenes establecidos por el documento vigente correspondiente del NCCLS.

8. Responsabilidades

El personal de la sección de control de calidad será el responsable de la realización de la técnica y de su lectura, así como de la aceptación o rechazo de los lotes que deberá anotarlos en el libro de registro central e informar a todo el personal implicado en la realización de esta técnica.

La realización diaria de las pruebas de sensibilidad por el método de difusión con discos con las cepas ATCC corresponde al personal del/los laboratorio/s que realice/n diariamente las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.

9. Anotaciones al procedimiento

Algunos microorganismos no crecen en agar Mueller-Hinton y por tanto no se puede realizar la determinación de sensibilidad a antimicrobianos en este medio. En el caso de estreptococos se puede suplementar este medio con 5% de sangre desfibrinada de carnero o caballo, para *Haemophilus* se utilizará el medio HTM (*Haemophilus* Test Medium) y para *Neisseria gonorrhoeae* se utilizará agar chocolate-Mueller-Hinton. Las cepas control que se deben utilizar para controlar los correspondientes medios y discos son: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 y *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226, respectivamente. Asimismo, los rangos aceptables para cada combinación antimicrobiano/cepa ATCC se indican en el documento vigente del NCCLS, actualmente el M100-S14. Vol.24 No. 1. Enero 2004.

10. Limitaciones del procedimiento

El método permite la determinación de sensibilidad a antimicrobianos de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, pero no está estandarizado para la determinación de sensibilidad a antimicrobianos de microorganismos anaerobios estrictos.

11. Documentos de consulta

1. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH (eds). 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
2. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Nº 10. Procedimientos en Microbiología Clínica 2000. Coordinador: E. Loza; Editor: J.J. Picazo.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement. Approved Standard M100-S14. Vol. 24 No. 1. NCCLS Wayne, Pennsylvania.

12. Anexos

Anexo I: Antimicrobianos recomendados por el NCCLS para determinación e informe de sensibilidad. Cada laboratorio puede establecer su propia normativa en función de la política de antibióticos de su centro y de las indicaciones de su comisión de infecciones.

Estafilococos:

Oxacilina, penicilina, eritromicina (o claritromicina o azitromicina), clindamicina, linezolid, cotrimoxazol, vancomicina.

Enterococos:

Ampicilina o penicilina, linezolid, quinupristina-dalfopristina, vancomicina. Gentamicina y estreptomina (screening de resistencia de alto nivel en aislados de sangre y LCR).

Enterobacterias:

Ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico o piperacilina/tazobactam, piperacilina o ticarcilina, cefalotina o cefazolina, cefamandol, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima, cefepima, gentamicina, ampicacina, ertapenem, imipenem o meropenem, ciprofloxacino o levofloxacino, cotrimoxazol.

Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter spp.

Ceftazidima, ticarcilina o piperacilina, aztreonam, gentamicina, tobramicina, ampicilina, ciprofloxacino, imipenem, meropenem.

Streptococcus (excluyendo neumococo):

Penicilina o ampicilina, cefotaxima, eritromicina, clindamicina, vancomicina, levofloxacino.

Streptococcus pneumoniae:

Penicilina, cefotaxima, eritromicina, cotrimoxazol, clindamicina, levofloxacino, vancomicina.

Haemophilus spp.

Ampicilina, cotrimoxazol, cefotaxima, cefuroxima, meropenem.

Documento de control de calidad interno para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos por el método de gradiente de difusión (E-test)

1. Objetivo

Los objetivos de un programa de control de calidad para el método de gradiente de difusión son: monitorizar la precisión y exactitud del procedimiento, el funcionamiento de los reactivos (medios y tiras de E-test), y el modo de proceder de las personas que realizan la prueba, la leen, la interpretan e informan los resultados. Para alcanzar estos objetivos se utilizan cepas control que se seleccionan en base a su estabilidad genética y su utilidad para validar esta prueba.

2. Fundamento

Utilizando este método se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un microorganismo en cultivo puro a diferentes antimicrobianos. El sistema E- test (PDM Epsilometer; AB Biodisk, Solna. Suecia) es un método para la determinación cuantitativa de la sensibilidad a antimicrobianos que utiliza una tira de plástico en la que existe un gradiente preformado de un antimicrobiano. Al poner en contacto la tira con el agar, el antimicrobiano difunde en el medio formando un gradiente en el mismo. Con este método, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se lee directamente sobre la escala que está en la tira, y es el punto donde la elipse de inhibición del crecimiento coincide con la tira. El medio de cultivo donde se realiza este antibiograma debe ser estándar (generalmente Mueller-Hinton agar) y el inóculo debe estar asimismo estandarizado.

3. Cepas de referencia

Al tratarse de un método no estandarizado por el NCCLS, no existen cepas de referencia recomendadas por el mismo para controlar la precisión y exactitud de este método. No obstante, la compañía proveedora recomienda seguir la normativa vigente del NCCLS y dispone de una normativa específica para muchos casos concretos. Por tanto, las cepas de referencia que se deben utilizar cuando se determina la sensibilidad de bacterias no fastidiosas son:

Enterococcus faecalis ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 35218. Esta última cepa solamente se utiliza como control de las combinaciones de beta-lactámico con inhibidor de beta-lactamasas, como ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. *E. faecalis* ATCC 29212 se utiliza para monitorizar los niveles de inhibidores de trimetoprim o sulfamidas en agar Mueller-Hinton.

Las cepas de referencia se deben obtener de una fuente fiable, y deben mantenerse cultivos stock de las mismas de forma que se asegure su viabilidad y que se evite en lo posible la selección de mutantes resistentes.

4. Periodicidad

Obligatoriamente cada nuevo lote de agar Mueller-Hinton se debe probar con las cepas de referencia anteriormente indicadas antes de utilizarse y también se debe probar cada nuevo lote de tiras de E-test que se vayan a utilizar.

Es recomendable la utilización de las cepas de referencia cada vez que se realice una prueba de E-test con aislados clínicos. Esta frecuencia se puede reducir si los resultados son satisfactorios durante 30 días seguidos, considerando satisfactorio el que no más de 3 de cada 30 diámetros de inhibición

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica CCI-SEIMC-05

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 7/16

estén fuera de los límites aceptados por el NCCLS. En este momento es suficiente utilizar las cepas ATCC una vez por semana o cada vez que alguno de los medios cambie.

Si la CMI está fuera de los límites permitidos, se debe realizar una acción correctora, como puede ser la repetición diaria de la prueba con cepas ATCC.

5. Medios de cultivo, Reactivos y Productos

- Tiras de E-test
- Tubos con solución salina al 0,85% o caldo de cultivo
- Placas de agar Mueller-Hinton
- Placas de agar Mueller-Hinton con 5% sangre (en su caso)
- Placas de agar Mueller-Hinton chocolate (en su caso)
- Placas de agar HTM (*Haemophilus* Test Medium) (en su caso)
- Escala de MacFarland (tubos con diferentes concentraciones de sulfato de bario)

Localización: las tiras de E-test de los diferentes antimicrobianos se deben guardar congeladas a -20°C , y las placas con los medios de cultivo se deben guardar en nevera. La escala de MacFarland debe guardarse a temperatura ambiente.

6. Procedimiento

Los cultivos de cepas ATCC que se vayan a utilizar deben ser recientes (18-24 h) y estar crecidos en medio de agar sangre. Los antimicrobianos a ensayar frente a cada microorganismo están indicados en el anexo I, aunque puede haber variaciones en cuanto a antimicrobianos a ensayar en los diferentes laboratorios. Siempre que se utilice un nuevo antimicrobiano debe ensayarse con las cepas de referencia.

Aparatos y material necesario:

- Torundas de algodón estériles
- Pinzas
- Escala de McFarland

- 1.- Sacar las tiras de E-test del congelador y dejar a temperatura ambiente 30 minutos para que se atemperen.
- 2.- Rotular un tubo de solución salina por cada cepa ATCC.
- 3.- Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de agua destilada con varias colonias del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland. Agitar con un agitador Vortex (alternativamente se pueden utilizar para el inóculo microorganismos crecidos en un caldo de cultivo que posteriormente se debe ajustar al 0,5 de la escala de McFarland (con bacterias anaerobias se ajustará al 1 de McFarland). En el caso de microorganismos fastidiosos siempre se debe hacer la suspensión en caldo de cultivo.
- 4.- Impregnar la torunda de algodón con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo y sembrar con ella toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones rotándola 3 veces.
- 5.- Con ayuda de unas pinzas previamente flameadas y frías colocar las tiras de E-test de los diferentes antimicrobianos sobre la placa antes de 15 minutos desde que se inoculó la placa con la suspensión bacteriana.
- 6.- Incubar en estufa a 37°C (antes de 15 minutos desde que se aplicaron los discos), durante 18-24 horas. En el caso de estafilococos y estreptococos la incubación debe ser de 24 horas completas.
- 7.- Una vez realizada la determinación, las cepas ATCC se guardarán en nevera a $4^{\circ}\text{-}8^{\circ}\text{C}$.

7. Obtención de resultados y criterios de aceptación y rechazo

1. Leer la CMI, que es el punto donde corta el crecimiento del microorganismo con la tira de E-test y anotar los resultados (en µg/ml) en una hoja de registro correspondiente. Siempre se debe leer el punto en el que existe una completa inhibición del crecimiento, incluyendo velos de crecimiento y colonias aisladas.
2. Rangos aceptables: los resultados de las CMIs para cada combinación de antimicrobiano/cepa ATCC se indican en el documento vigente del NCCLS, que en el momento actual es el M100-S14. Vol.24 No. 1. Enero 2004.
3. Criterios de aceptación y rechazo: no se aceptará ningún lote de medios o discos si las CMIs de los correspondientes antimicrobianos no están dentro de los márgenes establecidos por el documento vigente correspondiente del NCCLS para el método de determinación de CMIs.

8. Responsabilidades

El personal de la sección de control de calidad será el responsable de la realización de la técnica y de su lectura, así como de la aceptación o rechazo de los lotes que deberá anotarlos en el libro de registro central e informar a todo el personal implicado en la realización de esta técnica.

La realización diaria de las pruebas de sensibilidad por el método de E-test con las cepas ATCC corresponde al personal del/los laboratorio/s que realice/n diariamente las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.

9. Anotaciones al procedimiento

Algunos microorganismos no crecen en agar Mueller-Hinton y por tanto no se puede realizar la determinación de sensibilidad a antimicrobianos en este medio. En el caso de estreptococos se puede suplementar este medio con 5% de sangre desfibrinada de carnero o caballo, para *Haemophilus* se utilizará el medio HTM (*Haemophilus* Test Medium) y para *Neisseria gonorrhoeae* se utilizará agar chocolate-Mueller-Hinton. Las cepas control que se deben utilizar para controlar los correspondientes medios y discos son: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 y *Neisseria gonorrhoeae* ATCC 49226, respectivamente. Asimismo, los rangos aceptables para cada combinación antimicrobiano/cepa ATCC se indican en el documento vigente del NCCLS, actualmente el M100-S14. Vol.24 No. 1. Enero 2004.

10. Limitaciones del procedimiento

El método permite la determinación de sensibilidad a antimicrobianos de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, así como de microorganismos anaerobios estrictos, pero se deben seguir las recomendaciones específicas de los fabricantes para utilizarlo en cada caso concreto, ya que según los diferentes microorganismos y antimicrobianos puede haber variaciones en la técnica. Existe información disponible por la compañía para cada caso que se facilita en una página web (www.abbiotest.com) o a través de e-mail (etest@abbiotest.com).

Documento de control de calidad interno de la determinación de niveles de antimicrobianos en fluidos orgánicos

1. Objetivo

Los objetivos de la monitorización de las concentraciones de antimicrobianos en fluidos orgánicos son optimizar el tratamiento y minimizar la toxicidad de los antimicrobianos. El objetivo de un programa de control de calidad para la determinación de niveles de antimicrobianos en fluidos orgánicos es asegurar que los resultados obtenidos se corresponden realmente con las concentraciones de los diferentes antimicrobianos en los fluidos orgánicos. Estas concentraciones se expresan en µg/ml y generalmente se determinan en sangre, LCR y líquido peritoneal.

2. Fundamento

La selección del sistema adecuado para cada antimicrobiano y cada centro debe basarse en la sensibilidad y especificidad del ensayo, su precisión y su rapidez. También debe influir en la elección de un sistema u otro la experiencia que se requiera para manejar los equipos, el coste de los equipos y reactivos, las fechas de caducidad, la frecuencia de determinaciones requeridas, y la capacidad de que un mismo equipo se pueda utilizar para medir diferentes drogas. En la mayoría de los laboratorios, la determinación de niveles de antimicrobianos se realiza mediante un sistema fluorométrico automatizado (Abbott TDX-FLX) que permite detectar la concentración de aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amicacina) y glicopéptidos (vancomicina) en diferentes fluidos orgánicos. La normativa de calidad indicada para los ensayos realizados con este sistema puede aplicarse a otros del mismo tipo.

3. Materiales de referencia:

- Controles de vancomicina (Abbott 9523-10)
- Controles de gentamicina (Abbott 9512-10)
- Controles de tobramicina (Abbott 9510-10)
- Controles de amicacina (Abbott 9508-10)
- Calibradores de vancomicina (Abbott 9523-01)
- Calibradores de gentamicina (Abbott 9512-01)
- Calibradores de tobramicina (Abbott 9510-01)
- Calibradores de amicacina (Abbott 9508-01)

Material auxiliar:

- Sistema TDX-FLX Abbott
- Cubetas para muestras (Abbott 9518-05)
- Tubos de lectura (Abbott 9518-06)
- Carrusel para cubetas y tubos (Abbott 9518-11)
- Pipeta de 40-200 µl
- Puntas de pipeta de plástico

Localización: los calibradores se guardan en nevera. El resto del material se guarda a temperatura ambiente.

4. Periodicidad

Con cada determinación que se realice con una muestra clínica se debe incluir un control del antimicrobiano correspondiente, que debe proporcionar unos resultados entre los márgenes indicados en la hoja de controles de niveles de antimicrobianos (Ver Hoja de Valores de Controles, Anexo I).

Mantenimiento:

Diariamente se realizará el cebado del sistema como se indica en los puntos 6 y 7 del apartado de Procedimiento de este documento.

1. Se realizará el chequeo óptico del sistema mensualmente.
2. Se realizará el chequeo de pipeteo una vez al mes.
3. Se realizará el chequeo de temperatura una vez al mes.
4. Para la realización de todos los chequeos se consultará el Manual del sistema de determinación de niveles en fluidos orgánicos Abbott TDX-FLX. 1993.
5. Se anotará la fecha y las iniciales de la persona que realiza y revisa los chequeos en el **Formato PNT-AB-03-02. Hoja de Control de Chequeos** y los resultados impresos se guardarán en un archivo hasta la siguiente determinación, donde se guardarán los nuevos y se descartarán los anteriores.

Calibración:

1. Se realizará cada vez que los controles den unos valores que estén fuera de los rangos indicados.
2. Se realizará cuando se cambie de lote de reactivos.
3. Se realizará como mínimo una vez al mes.
4. Los resultados se anotarán en el **Formato PNT-AB-03-02. Hoja de Control de Chequeos**.

5. Reactivos y Productos

- Reactivo de vancomicina (Abbott 9523-85)
- Reactivo de gentamicina (Abbott 9512-85)
- Reactivo de tobramicina (Abbott 9510-85)
- Reactivo de amicacina (Abbott 9508-85)
- Buffer de dilución (Abbott 9519)
- Pipet Check solution (Abbott 9531-02)
-

Localización: Nevera a 4°C. Se deben guardar reactivos y controles de reserva en otra nevera.

6. Procedimiento

1. Encender el sistema TDX-FLX Abbott accionando el interruptor de la parte posterior del aparato.
2. Aparece en la pantalla digital del aparato la palabra "DATE". Escribir la fecha empezando por el día (dos dígitos), el mes (dos dígitos) y el año (dos dígitos) separados por un punto.
3. Accionar la tecla rotulada como "YES".
4. Aparece en la pantalla digital del aparato la palabra "TIME". Escribir hora, minutos y segundos separados por un punto.
5. Aparece en la pantalla "READY".
6. Accionar 3 veces seguidas la tecla rotulada como "PRIME" y esperar a que el aparato deje de emitir sonidos (cebado del sistema).
7. Accionar 2 veces seguidas la tecla rotulada como "PRIME" y esperar a que el aparato deje de emitir sonidos (cebado del sistema).
8. Cargar el carrusel con tantas cubetas de muestra y tubos de lectura como determinaciones solicitadas y ajustar accionando la rueda.
9. Poner 90 µl de cada muestra y del/los controles correspondientes en la parte en embudo de la cubeta procurando no hacer burbujas.
10. Colocar el carrusel con las muestras y los controles en la máquina y ajustar para que quede fijo.

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica CCI-SEIMC-05

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 12/16

11. Colocar los reactivos correspondientes a la/s determinación/es solicitada/s en el dispositivo del aparato destinado a tal efecto.
12. Cerrar la puerta del aparato y accionar la tecla "RUN"
13. Preguntará si está "OK", si es así, accionar la tecla "YES".
14. Aparecerá en la pantalla la petición de las localizaciones de las diferentes muestras y controles y hay que indicar la localización de cada petición.
15. Una vez indicadas las peticiones correspondientes a cada localización, si todo es correcto, accionar la tecla "RUN".
16. Cuando el aparato finaliza la determinación emite un informe impreso con los resultados.

7. Obtención de resultados y criterios de aceptación y rechazo

1. Al finalizar las determinaciones, el sistema TDX-FLX Abbott emite un informe impreso con los resultados.
2. Este informe se revisará por el técnico que ha realizado la determinación informando al facultativo que dará como válida la determinación si los controles dan un resultado dentro de los márgenes indicados para cada uno de ellos (ver Hoja de Valores de Controles. Anexo I).
3. Los resultados de controles y muestras se anotarán en el **Formato PNT-AB-03-01. Registro de Resultados de Niveles de Antimicrobianos.**

8. Responsabilidades

Los técnicos serán los responsables de la realización de la técnica.

El facultativo será el responsable de interpretar y validar los resultados obtenidos. En caso de que los controles estén fuera de los márgenes establecidos se debe proceder a la calibración del sistema.

9. Anotaciones al procedimiento

En ocasiones, la concentración de antimicrobianos en la muestra problema está por debajo del límite inferior de detección del sistema o por encima del mismo. En estas situaciones en el informe impreso del equipo aparecerán las indicaciones "LOW" o "HIGH", respectivamente. En el caso de que la indicación sea "LOW", el resultado que se debe informar es "inferior a" el valor de la sensibilidad de la determinación de cada antimicrobiano (ver hoja de controles de niveles de antimicrobianos), y en el caso de que sea "HIGH", se debe informar "superior a" el valor del calibrador de cada antimicrobiano (ver Hoja de Valores de Controles, Anexo I). No obstante, siempre que exista muestra suficiente se realizará una dilución $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{10}$ de la misma y se repetirá la determinación en la muestra diluida, informando el valor exacto. En caso de que se diluya la muestra, el resultado proporcionado por el sistema se multiplicará por el valor de la dilución utilizada, y este será el resultado definitivo. Se deben incluir nuevamente controles cuando se realicen nuevas determinaciones.

10. Limitaciones del procedimiento

Este sistema exclusivamente permite la determinación de niveles en las muestras indicadas, y no es compatible con reactivos de otra marca comercial para la determinación de niveles de otros antimicrobianos diferentes a los indicados.

ANEXO I. HOJA DE VALORES DE CONTROLES

VANCOMICINA

	L	5,5-8,5
CONTROLES (µg/ml)	M	30-40
	H	63-87

Sensibilidad: 2,0 µg/ml

Calibrador F: 100 µg/ml

GENTAMICINA

	L	0,85-1,15
CONTROLES (µg/ml)	M	3,6-4,4
	H	7,2-8,8

Sensibilidad: 0,27 µg/ml

Calibrador F: 10 µg/ml

AMICACINA

	L	4,25-5,75
CONTROLES (µg/ml)	M	13,5-16,5
	H	27-33

Sensibilidad: 0,8 µg/ml

Calibrador F: 50 µg/ml

TOBRAMICINA

	L	0,85-1,15
CONTROLES (µg/ml)	M	3,6-4,4
	H	7,2-8,8

Sensibilidad: 0,18 µg/ml

Calibrador F: 10 µg/ml

CCI-SEIMC-06

RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN MICOBACTERIOLOGÍA

Fernando Alcaide Fernández de Vega

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Bellvitge. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias. Universidad de Barcelona. c/ Feixa Llarga s/n. 08907-L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona. Teléfono: 93 2607930. Fax: 93 2607547. E-mail: falcaide@csb.scs.es

Julián González Martín

Servicio de Microbiología. Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias. Universidad de Barcelona. c/ Villarroel, 170. 08036-Barcelona. Teléfono: 93 2275522. Fax: 93 2279372 E-mail: gonzalez@clinic.ub.es

Índice

1. Objeto
2. Alcance
3. Personal
4. Condiciones ambientales del laboratorio de Micobacteriología
5. Baciloscopia-Tinciones
6. Digestión-Descontaminación para el cultivo
7. Cultivo de micobacterias en medios sólidos y líquidos
8. Procedimiento para el cultivo de micobacterias en medio líquido mediante sistemas semi o totalmente automatizados
9. Identificación convencional de micobacterias
10. Identificación de micobacterias mediante técnicas cromatográficas
11. Identificación de micobacterias mediante técnicas moleculares
12. Pruebas de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*
13. Pruebas de sensibilidad de *Mycobacterium avium-intracellulare*
14. Pruebas de sensibilidad de *Mycobacterium kansasii*
15. Pruebas de sensibilidad de micobacterias de crecimiento rápido
16. Resumen de las recomendaciones
17. Bibliografía
18. Anexo I. Cepas de Referencia recomendadas
19. Anexo I. Tablas

1. OBJETO

Los programas de control de calidad aseguran que la información generada por el laboratorio es exacta, adecuada y reproducible.

El propósito de las presentes recomendaciones es establecer las directrices para asegurar la calidad en los procedimientos microbiológicos de Micobacteriología Clínica en lo que afecta tanto al procesamiento inicial de las muestras como a los procesos analíticos, incluyendo los controles de medios y reactivos necesarios en las diversas técnicas analíticas. Asimismo, este documento establece las recomendaciones generales sobre la dotación y condiciones estructurales adecuadas de los laboratorios de micobacterias.

2. ALCANCE

Las recomendaciones se aplicarán a los diferentes procedimientos o ensayos que se realizan para diagnosticar las infecciones micobacterianas en los laboratorios de Microbiología Clínica.

3. PERSONAL

Los análisis deben ser realizados por personal técnico cualificado con experiencia en Microbiología.

La supervisión de los análisis y la interpretación de los resultados deben realizarse por personal facultativo especialista en Microbiología Clínica. Dada las diversas peculiaridades que tiene la micobacteriología Clínica es deseable que el personal tenga formación adicional específica en esta materia.

4. CONDICIONES AMBIENTALES DEL LABORATORIO DE MICOBACTERIOLOGÍA

Las condiciones ambientales requeridas para desarrollar los ensayos relacionados con la Micobacteriología Clínica presentan determinadas peculiaridades que deben reseñarse y que se describen a continuación.

4.1. Condiciones de bioseguridad

Aunque la mayoría de las especies micobacterianas son agentes biológicos del grupo 2, el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que es el más frecuentemente aislado de muestras clínicas, está clasificado dentro del grupo de biopeligrosidad 3 y requiere unas condiciones de bioseguridad de nivel 3. Por tanto, todo laboratorio de Microbiología debería disponer de un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad, si realiza aislamiento en muestras clínicas e identificación al nivel de especie de cepas provenientes de pacientes sospechosos de padecer una infección causada por el complejo *M. tuberculosis*. Los aspectos fundamentales de este laboratorio con un nivel de contención 3 se basan en disponer de cabinas de seguridad biológica (CSB) de clase II, aire acondicionado independiente, sin recirculación de aire, con presión negativa respecto a la presión atmosférica exterior, separación con doble puerta, así como superficies impermeables al agua, resistentes a ácidos, álcalis, disolventes y desinfectantes y ser de fácil limpieza. Es importante reseñar que el aire extraído del lugar de trabajo debiera ser filtrado mediante la utilización de filtros de alta eficiencia para partículas en el aire (HEPA). Además estos laboratorios deberían contar con material y equipos propios, con especial referencia a las centrifugas que deben disponer de rotores o cestillos de seguridad que protejan de los aerosoles.

Por otro lado es fundamental no olvidar que, dentro de las barreras primarias como son las CSB, se encuentran los equipos o prendas de protección personal (ojos, cara, manos, brazos...).

4.2. Programa de limpieza

El programa de limpieza es similar al del laboratorio general de Microbiología. Sin embargo, la limpieza de las poyatas u otras zonas donde se manejen cultivos de micobacterias se debería realizar con etanol al 70%, hipoclorito sódico o fenol al 5% en superficies metálicas. Otros desinfectantes no destruyen de forma tan eficaz las micobacterias.

5. BACILOSCOPIA-TINCIONES

El control de calidad de la baciloscopia es un elemento indispensable para un control eficaz de la tuberculosis. Ello concierne a todo el proceso: recogida de la muestra, preparación del frotis, la tinción y el examen microscópico.

Básicamente el control interno de calidad deberá centrarse en la valoración de dos apartados: a) Los reactivos de la tinción. En cada lote de reactivos nuevo sería recomendable comprobar su capacidad de tinción de los bacilos ácido-alcohol resistentes antes de su utilización. b) El procedimiento de la tinción. Sería conveniente incorporar una extensión de control diaria para verificar la correcta realización de la técnica.

• Preparación

- Se deberían llevar a cabo suspensiones con un 1 ml de suero fisiológico o agua destilada de una turbidez 1 McFarland de *Escherichia coli* como control negativo y *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium kansasii* como control positivo. No es recomendable utilizar micobacterias de crecimiento rápido al no teñirse de forma constante.
- Las extensiones y tinciones se realizarán igual que en cualquier muestra clínica.

• Evaluación

- Tinciones con fucsina (Ziehl-Neelsen o Kinyoun): los bacilos ácido-alcohol resistentes (micobacterias) se observarán de color rojo o magenta. Los bacilos del control negativo (*E. coli*) se verán de color azul o verde dependiendo del contracolorante utilizado.
- Tinciones con fluorocromo (Auramina O o Auramina-Rodamina): los bacilos ácido-alcohol resistentes (micobacterias) se observarán de color amarillo o amarillo-verdoso fluorescente. Los bacilos del control negativo (*E. coli*) no emitirán fluorescencia.
- Los resultados deberán registrarse. Cuando estos no sean correctos se debería revisar el procedimiento y los reactivos.

6. DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN PARA EL CULTIVO

El control de calidad se debería basar fundamentalmente en: a) La correcta preparación y esterilidad de los reactivos utilizados en la descontaminación y neutralización. b) La eficacia del proceso de descontaminación sobre las muestras.

• Preparación

- Cuando se utilicen reactivos de fabricación propia, en cada lote se debería comprobar que el pH es el adecuado de acuerdo a la descripción del método.
- Se efectuará un control de esterilidad de las soluciones de descontaminación y neutralización sembrando una placa de agar sangre o chocolate de cada lote e incubando a 35-37°C durante 5 días.

• Evaluación

- Antes de su uso se debería comprobar que las soluciones de descontaminación y neutralización presentan las características macroscópicas adecuadas de estabilidad y esterilidad.
- El control de esterilidad no deberá presentar crecimiento.

- La eficacia del proceso de descontaminación se puede efectuar monitorizando el porcentaje de muestras contaminadas entre las que recibieron la descontaminación. Es recomendable realizar evaluaciones periódicas (por ej. trimestrales). Cuando se esté instaurando un nuevo método de descontaminación en el laboratorio las evaluaciones deberían realizarse con mayor frecuencia; por ejemplo, de forma quincenal durante los 2-3 primeros meses. En general se admite en la literatura que un porcentaje de contaminación entre el 3 y el 5% de las muestras garantiza una buena descontaminación. Sin embargo, estos márgenes deberían ser orientativos y no límites de estricto cumplimiento.

7. CULTIVO DE MICOBACTERIAS EN MEDIOS SÓLIDOS Y LÍQUIDOS

El control de calidad de los medios de cultivo debería ir dirigido a dos aspectos fundamentales: a) La esterilidad del medio. Esencial para poder descartar que el crecimiento obtenido es, realmente, de la muestra y no del propio medio con una posible contaminación. b) El rendimiento, eficiencia o calidad del medio. Consiste en valorar el rendimiento del medio en la recuperación de micobacterias. Esto sería aconsejable en cada nuevo lote de medios preparados en el propio laboratorio. Los medios comerciales deberán tener un certificado de la calidad del mismo y, por ello, en un principio, no sería necesario controlar de nuevo este aspecto en el laboratorio.

• Procedimiento

- Cada día, se deberá examinar el color, la presencia de deshidratación (medios sólidos) y la fecha de caducidad de los medios a utilizar.
- Para el control de *esterilidad* se deberá de incubar a 35-37°C durante 5 días una placa o tubo del medio de cada nuevo lote que se inicie.
- El control del *rendimiento o eficiencia* del medio se debería realizar en cada nuevo lote fabricado en el laboratorio. Para ello se pueden realizar suspensiones en suero fisiológico o agua destilada de una turbidez 0,5 McFarland de *M. tuberculosis*, *M. avium* y *Escherichia coli*. Se inocularán entre 10-50 µl de cada suspensión en los medio a probar y se procederá a su incubación a 35-37°C en 5-10% de CO₂ durante 21 días.

• Evaluación

- En el control de esterilidad no se deberá observar crecimiento en el medio.
- En el control de eficiencia se debería constatar crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. avium*, pero una inhibición parcial o completa de *E. coli*.
- Los resultados deberán registrarse. Cuando estos no sean correctos se deberían llevar a cabo nuevos controles. Las medidas correctivas podrían incluir la realización de nuevas pruebas adicionales que determinen el problema del medio o la notificación al fabricante para el reemplazo completo del lote. En los medios fabricados en el laboratorio habría que revisar el procedimiento de preparación y los reactivos utilizados.

8. PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO DE MICOBACTERIAS EN MEDIO LÍQUIDO MEDIANTE SISTEMAS SEMI O TOTALMENTE AUTOMATIZADOS

Cada uno de los equipos de cultivo y detección temprana de micobacterias tiene sus propios sistemas para el control de la calidad de los instrumentos, ya sean automáticos o semiautomáticos. En cada caso se deberán seguir las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

El control de calidad de los medios de cultivo utilizados será igual que el descrito en el apartado anterior (7).

9. IDENTIFICACIÓN CONVENCIONAL DE MICOBACTERIAS

9.1. Velocidad de crecimiento

- El control del *rendimiento* o *eficiencia* del medio se debería realizar en cada nuevo lote fabricado en el laboratorio.
- Cepas de control:
 - Micobacteria de crecimiento rápido: *Mycobacterium fortuitum* o *Mycobacterium chelonae*.
 - Micobacteria de crecimiento lento: *M. tuberculosis* o *M. kansasii*.

9.2. Pigmentación (cromogenicidad)

- El control del *rendimiento* o *eficiencia* del medio se debería realizar en cada nuevo lote fabricado en el laboratorio.
- Cepas de control:
 - Micobacteria no cromógena: *M. fortuitum*.
 - Micobacteria fotocromógena: *M. kansasii*.
 - Micobacteria escotocromógena: *Mycobacterium gordonae*.

9.3. Temperatura óptima de crecimiento

- Se requerirá un control y registro adecuado de la temperatura y % de CO₂, cuando proceda, de las estufas o incubadoras.

9.4. Pruebas bioquímicas

9.4.1. Prueba de la Arilsulfatasa

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
- Prueba de los 3 días:
 - Control positivo: *M. fortuitum* o *Mycobacterium xenopi*.
 - Control negativo: *M. tuberculosis* o *M. intracellulare*.
 - Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).
- Prueba de los 14 días:
 - Control positivo: *Mycobacterium triviale*.
 - Control negativo: *Mycobacterium terrae*.
 - Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).

9.4.2. Prueba de la Catalasa semicuantitativa

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Catalasa > 45 mm: *M. fortuitum*.
 - Catalasa < 45 mm: *M. tuberculosis*.

9.4.3. Prueba de la Catalasa termoestable

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo a 22-25°C y a 68°C: *M. fortuitum*.
 - Control positivo a 22-25°C y negativo a 68°C: *M. tuberculosis*.
 - Control negativo a cualquier temperatura: tubo sin sembrar (opcional).

9.4.4. Prueba de la reducción del Citrato férrico amónico

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo: *M. fortuitum*.

- Control negativo: *M. chelonae*.
- Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).

9.4.5. Prueba del Crecimiento en agar MacConkey sin cristal violeta

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo: *M. fortuitum*.
 - Control negativo: *M. phlei* o *M. kansasii*.
 - Control negativo del medio: placa sin sembrar (opcional).

9.4.6. Prueba de sensibilidad a la Hidracida del Ácido Tiofeno-2-Carboxílico (TCH)

- Se deberían utilizar controles con cada lote nuevo de solución stock o madre de TCH.
 - Control sensible al TCH: *M. bovis*.
 - Control resistente al TCH: *M. tuberculosis*.

9.4.7. Prueba de la Niacina

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo: *M. tuberculosis*.
 - Control negativo: *M. intracellulare* o *M. avium*.
 - Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).

9.4.8. Prueba de los Nitratos (reducción)

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo: *M. tuberculosis*.
 - Control negativo: *M. intracellulare* o *M. avium*.
 - Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).

9.4.9. Prueba de la Pirazinamidasasa

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo: *M. intracellulare*.
 - Control negativo: *M. kansasii*.
 - Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).

9.4.10. Prueba de la tolerancia al Cloruro Sódico

- Se deberían utilizar controles con cada lote nuevo de medio de Löwenstein-Jensen con un 5% de NaCl.
 - Control positivo (crecimiento en el medio): *M. fortuitum*.
 - Control negativo (sin crecimiento en el medio): *M. gordonae*.

9.4.11. Prueba de la reducción del Telurito potásico

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo: *M. intracellulare*.
 - Control negativo: *M. tuberculosis*.
 - Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).

9.4.12. Prueba de la hidrólisis del Tween 80

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo fuerte (< 5 días): *M. kansasii*.
 - Control positivo débil (5-10 días): *M. gordonae*.
 - Control negativo: *M. intracellulare*.
 - Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).

9.4.13. Prueba de la Ureasa

- Se deberían utilizar controles con cada prueba o grupo de pruebas que se lleven a cabo de forma simultánea.
 - Control positivo: *M. kansasii*.
 - Control negativo: *M. intracellulare*.
 - Control negativo de reactivo: tubo sin sembrar (opcional).

10. IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Dos técnicas son las más difundidas: la cromatografía de gas (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). También se ha utilizado la cromatografía en capa fina (TLC), aunque es de aplicación más residual. El control de calidad debería dirigirse a: a) la correcta extracción de los ácidos micólicos de la cepa en estudio. b) La obtención de perfiles cromatográficos adecuados de cada cepa.

- Preparación
 - En cada lote de extracción debería incluirse una cepa conocida (por ej. *M. tuberculosis*, *M. kansasii* o *M. gordonae*).
 - Es necesario disponer de un patrón de ácidos grasos que incluya la mayor parte de los presentes en la pared de las micobacterias. Pueden obtenerse preparaciones comerciales que cumplan este fin.
- Evaluación
 - La cepa de control incluida desde el inicio del proceso debería obtener su perfil cromatográfico característico.
 - Es aconsejable analizar el patrón de ácidos grasos cada vez que: varíen las condiciones de trabajo del cromatógrafo, se cambie la columna o se perciban alteraciones en los perfiles cromatográficos de las muestras.

11. IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Diversas técnicas de biología molecular se han aplicado en los últimos años a la identificación de micobacterias. Algunas de ellas se han desarrollado comercialmente, como son las sondas de hibridación de ácidos nucleicos y los métodos basados en hibridación reversa sobre tiras de nitrocelulosa. Otras se aplican utilizando protocolos desarrollados o adaptados en los propios laboratorios, como son el polimorfismo de fragmentos de restricción (PRA), la secuenciación de fragmentos específicos o técnicas de amplificación dirigidas a la identificación.

El control de calidad debería basarse fundamentalmente en:

- a) La correcta preparación y conservación de los reactivos y soluciones utilizadas.
- b) La extracción adecuada de los ácidos nucleicos de la muestra.
- c) La evaluación adecuada de los resultados.

d) Evitar contaminaciones cruzadas entre las muestras, diseñando y utilizando correctamente las zonas de trabajo para cada una de las fases.

- **Preparación y evaluación**

- Deben establecerse etiquetados y controles de caducidad de los reactivos y soluciones de biología molecular, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes o de la literatura.
- En todas las técnicas que impliquen amplificación deberían incluirse un control negativo y un control positivo (por ej. *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. intracellulare* o *M. avium*).
- Las técnicas de presentación comercial dirigidas a la identificación de una especie concreta (por ej. sondas de hibridación) se pueden controlar analizando una cepa de referencia de la especie en cuestión en cada nuevo lote recibido (*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. avium*).
- Las técnicas de presentación comercial que identifican diversas especies de forma simultánea se pueden controlar analizando en cada nuevo lote de fabricación una cepa de control de una de las especies posibles a identificar.
- Cuando el proceso de lectura de resultados se realice con electroforesis deberían incluirse marcadores de peso molecular adecuados. En la técnica PRA es aconsejable usar marcadores que incluyan bandas con diferencias de 10 a 20 pares de bases y colocados con la frecuencia adecuada para poder evaluar pequeñas diferencias entre las bandas de las diversas muestras.

12. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE *Mycobacterium tuberculosis*

El control de calidad de las pruebas de sensibilidad en micobacterias pretende monitorizar:

- a) La precisión y fidelidad del procedimiento de sensibilidad antimicobacteriana.
- b) El rendimiento o eficiencia de los reactivos utilizados (antimicrobianos) en la prueba.
- c) La ausencia de contaminación en los medios y reactivos, así como en los inóculos.

Las concentraciones micobacterianas de los inóculos deberían seguir las instrucciones precisas de cada método. Cuando se requiera el cálculo de turbidez mediante el estándar de McFarland, es aconsejable realizar un control en cada medición o grupo de mediciones con patrones de sulfato de bario apropiados. Así mismo, el nefelómetro utilizado debería tener su propio control de calidad que el fabricante recomiende. Especial atención requiere el control adecuado del suministro eléctrico del lector así como la calidad y estado (transparencia) de los tubos utilizados en la medición.

En los métodos comerciales el periodo de incubación será el necesario para obtener una interpretación adecuada, dentro de los límites establecidos por el fabricante.

Cuando se utilicen métodos de preparación en el laboratorio se incubarán en atmósfera de CO₂ durante 4 semanas, con lecturas a la 3ª y 4ª semana.

Cepa de referencia:

- *M. tuberculosis*. Esta cepa es sensible a los antimicrobianos de primera línea activos contra este microorganismo.
- Se deberá utilizar la cepa control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano a estudiar.

Para el control de una posible contaminación bacteriana o fúngica, incluidos los cultivos mixtos, se debería sembrar a partir del inóculo una placa de agar chocolate e incubar a 35-37°C. El control de esterilidad del medio de cultivo variará según el método de sensibilidad utilizado (ver apartado de cultivo en medios sólidos y líquidos).

13. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE *Mycobacterium avium-intracellulare*

Para la preparación de las concentraciones micobacterianas de los inóculos deberían seguirse las mismas recomendaciones del apartado anterior.

En los métodos comerciales el periodo de incubación será el necesario para obtener una interpretación adecuada, dentro de los límites establecidos por el fabricante.

Cuando se utilicen métodos de cultivo sólidos en el laboratorio se incubarán en atmósfera de CO₂ durante 3 semanas.

Cepa de referencia:

- *M. intracellulare* o *M. avium*.
- Se deberá utilizar la cepa control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano a estudiar.

Para el control de una posible *contaminación* bacteriana o fúngica, incluidos los cultivos mixtos, se deberá sembrar a partir del inóculo una placa de agar chocolate e incubar a 35-37°C. El control de *esterilidad* del medio de cultivo variará según el método de sensibilidad utilizado (ver apartado de cultivo en medios sólidos y líquidos).

14. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE *Mycobacterium kansasii*

Para la preparación de las concentraciones micobacterianas de los inóculos deberían seguirse las mismas recomendaciones del apartado 12 y 13.

La incubación de las pruebas de sensibilidad para *M. kansasii* deberá ser a 37 ± 1°C hasta un máximo de 14 días con CO₂.

Es importante recordar las especificaciones concretas de cada fármaco o grupo de fármacos. Como ejemplo, cuando se estudien los macrólidos, la incubación deberá realizarse sin CO₂.

Cepa de referencia:

- *M. kansasii*. Esta cepa es sensible a los antimicrobianos de primera línea activos contra este microorganismo. En especial, la rifampicina, que es el antimicrobiano más importante de estudio en esta especie, cuya concentración crítica es de 1 µg/ml. Por otro lado, hay que tener en cuenta que *M. kansasii* presenta una sensibilidad disminuida a la isoniazida en comparación con *M. tuberculosis*. Las concentraciones críticas para este fármaco deberían ser ≥ 1 µg/ml.
- Es aconsejable utilizar la cepa control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano a estudiar.

Para el control de una posible *contaminación* bacteriana o fúngica, incluidos los cultivos mixtos, se deberá sembrar a partir del inóculo una placa de agar chocolate e incubar a 35-37°C. El control de *esterilidad* del medio de cultivo variará según el método de sensibilidad utilizado (ver apartado de cultivo en medios sólidos y líquidos).

15. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD DE MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Las cepas de referencia ideales para las pruebas de dilución serían aquellas en las que las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los diferentes antimicrobianos estuvieran en el medio del intervalo de las concentraciones estudiadas:

- *Mycobacterium peregrinum*, es la cepa recomendada con una incubación a 30°C durante 3 días. Alternativamente se puede utilizar *Staphylococcus aureus*.

- Es aconsejable utilizar la cepa control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano a estudiar.

Para el control de una posible *contaminación* bacteriana o fúngica, incluidos los cultivos mixtos, se deberá sembrar a partir del inóculo una placa de agar chocolate e incubar a 35-37°C. El control de *esterilidad* del medio de cultivo variará según el método de sensibilidad utilizado (ver apartado de cultivo en medios sólidos y líquidos).

16. RESUMEN DE LAS RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN MICOBACTERIOLOGÍA.

Normas de obligado cumplimiento

1. El Servicio de Microbiología tiene que elaborar y revisar anualmente los Manuales de las diversas técnicas y aparatos o instrumentos utilizados en micobacteriología. Dichos manuales o procedimientos deberán estar disponibles de forma permanente para todo el personal.
2. Se deberán establecer las normas de seguridad biológica mínimas exigibles para el manejo de *M. tuberculosis*.
3. Los procedimientos analíticos deberán ser realizados por personal técnico cualificado con experiencia en Microbiología.
4. La supervisión de los análisis, interpretación de los resultados, así como su validación e informe tienen que ser realizados por un titulado superior con la especialidad de Microbiología Clínica.
5. Los fabricantes que comercialicen medios, reactivos o sistemas para el diagnóstico y estudios de sensibilidad en micobacteriología deben garantizar un exhaustivo control de calidad de sus productos. Los laboratorios de Microbiología deberán llevar un seguimiento de los lotes y fechas de caducidad de los mismos. El control de calidad de los sistemas comerciales debe basarse en las recomendaciones del fabricante.
6. Cuando se utilicen lotes nuevos de medios o reactivos preparados o fabricados en el propio laboratorio deberán realizarse controles exhaustivos, fundamentalmente de esterilidad y de eficacia o rendimiento del mismo (ver los correspondientes apartados).
7. Deberá establecerse un control de la descontaminación realizada en las muestras de territorios corporales no estériles que cada laboratorio fijará de acuerdo a sus necesidades concretas.
8. Las pruebas bioquímicas y de amplificación genómica no comerciales deberán incorporar un control positivo y negativo en cada prueba o grupo de pruebas. En las tinciones bastará con incluir un control positivo diario.
9. En las pruebas de sensibilidad se deberá utilizar una cepa de control con los lotes nuevos de cada antimicrobiano estudiar.

Recomendaciones

Todas las normas recogidas en el documento a excepción de las reseñadas en el epígrafe anterior.

17. BIBLIOGRAFÍA

1. Inderlied, C. B., and K. A. Nash. 1996. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biologic fluids, p. 127–175. *In*: V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. 4th ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
2. Inderlied, C. B., and G. E. Pfyffer. 2003. Susceptibility Test Methods: Mycobacteria, p. 1149-1177. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington DC.
3. Master, R. N. 1995. Mycobacteriology p. 3.0.1-3.16.4. *In*: H. D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. M24-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.
5. Pfyffer, G. E., B. A. Brown-Elliott, and R. J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures, p. 532-559. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
6. Sewell, D. L., and J. D. MacLowry. 2003. Laboratory Management, p. 4-21. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology Press, Washington DC.
7. Vincent, V., B. A. Brown-Elliott, K. C. Jost, Jr., and R. J. Wallace, Jr. 2003. *Mycobacterium*: Phenotypic and Genotypic Identification, p. 560-584. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington DC.
8. Wilson, M. L., and L. B. Reller. 2003. Laboratory Design, p. 22-30. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology Press, Washington DC.

18. ANEXO I. CEPAS DE REFERENCIA RECOMENDADAS

Las cepas de referencia recomendadas en microbiología variará según las exigencias de las pruebas analíticas a realizar. De tal forma para los estudios de sensibilidad se recomiendan las cepas ATCC o equivalentes de otras colecciones tipo propuestas por la NCCLS. Para el resto de pruebas se pueden utilizar las cepas ATCC recomendadas en el presente documento o bien aislados clínicos correctamente caracterizados. Estos aislados podrían ser cepas comprobadas en, al menos, tres laboratorios o las utilizadas en el control de calidad externo de la SEIMC.

Las cepas de referencia recomendadas son:

- *Mycobacterium avium* ATCC 25291.
- *Mycobacterium bovis* ATCC 35734.
- *Mycobacterium chelonae* ATCC 35751.
- *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841.
- *Mycobacterium gordonae* ATCC 14470.
- *Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950.
- *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478.
- *Mycobacterium peregrinum* 7000686.
- *Mycobacterium phlei* ATCC 11758.
- *Mycobacterium terrae* ATCC 15755.
- *Mycobacterium triviale* ATCC 23292.
- *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

19. ANEXO II. TABLAS

Tabla 1. Propuesta de Control de calidad de las concentraciones críticas ($\mu\text{g/ml}$) a utilizar en las cepas de referencia para las pruebas de sensibilidad en *Mycobacterium tuberculosis*.

Método	Antimicrobiano ^a				
	Isoniacida	rifampicina	etambutol	estreptomicina	pirazinamida
Lowenstein	0,2	40	2	4	100
Jensen	(0,1 y 1)	(20)	(1)	(8)	(50 y 400)
Middlebrook 7H10	0,2	1	5	2	25
Middlebrook 7H11	0,2	1	7.5	2	ND ^b
Radiométrico	0,1	2	2.5	2	100
(BACTEC 460)	(0,4)		(7,5)	(6)	
BACTEC MGIT	0,1	1	5	1	100
	(0,4)		(7,5)	(4)	
MB/BACT	0,1	1	5	1	ND
	(0,4)				

^a Entre paréntesis se incluyen las concentraciones que pueden realizarse de forma adicional.

^b ND: no disponible

Tabla 2. Propuesta de Control de calidad de las CIMs en las cepas de referencia para las pruebas de sensibilidad de *Mycobacterium avium* complex.

Antimicrobiano	Intervalo propuesto ($\mu\text{g/ml}$)
Etambutol	1 - 16
Claritromicina	0,5 - 32

Tabla 3. Propuesta de Control de calidad de los antimicrobianos y concentraciones críticas ($\mu\text{g/ml}$) a utilizar en las cepas de referencia para las pruebas de sensibilidad en *Mycobacterium kansasii*.

Antimicrobiano	Concentraciones críticas ($\mu\text{g/ml}$)
Rifampicina	1 y 2 ^a
Rifabutina	0,5 y 2 ^a
Etambutol	5
Isoniacida	1 y 5 ^a
Estreptomicina	6 y 10 ^a
Claritromicina	32
Amikacina	10
Ciprofloxacino	2
Cotrimoxazol	2/38
Sulfametoxazol	32

^a Segundas concentraciones.

Tabla 4. Propuesta de Control de calidad de las CIMs en las cepas de referencia para las pruebas de sensibilidad en micobacterias de crecimiento rápido.

Antimicrobiano	<i>M. peregrinum</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. aureus</i> ($\mu\text{g/ml}$)
Amikacina	$\leq 1 - 4$	1 - 4
Cefoxitina	16 - 32	1 - 4
Ciprofloxacino	$\leq 0,12 - 0,5$	0,12 - 0,5
Claritromicina	$\leq 0,06 - 0,5$	0,12 - 0,5
Doxiciclina	0,12 - 0,5	0,12 - 0,5
Imipenem	2 - 16	ND ^a
Cotrimoxazol	$\leq 1 - 4$	32 - 128
Tobramicina	4 - 8	0,12 - 1

^a ND: No disponible.

CCI-SEIMC-07

Recomendaciones para el control de calidad interno en Micología Médica

Juan Luis Rodríguez Tudela¹ y Lurdes Matas i Andreu²

¹Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Ctra. Majadahonda-Pozuelo km. 2. 28220 Majadahonda. Teléfono: 91 822 3635. Fax: 91 509 79 66. Correo electrónico: juanl.rodriguez-tudela@isciii.es

²Profesor Asociado Universidad Autónoma de Barcelona. Servicio de Microbiología. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Carretera del Canyet s/n. Badalona. Barcelona. 08916. Teléfono 934 978 894 Fax: 934 978 895. Correo electrónico: lmatas@ns.hugtip.scs.es

Juan Luis Rodríguez Tudela actúa en representación del Grupo de Micología Médica de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Índice

Índice	2
Objeto	3
Alcance	3
Personal	3
Condiciones ambientales del laboratorio de Micología	3
Condiciones de bioseguridad	3
Programa de limpieza	3
Manuales de Procedimientos	4
Control de calidad interno de las diferentes tinciones que se utilizan para el examen directo de muestras sospechosas de contener hongos patógenos	4
Examen en fresco con clarificación por KOH	4
Tinción de blanco de calcofluor	4
Tinción de tinta china para la observación de la cápsula polisacárida de Cryptococcus spp.	4
Tinción con azul de lactofenol	4
Control de calidad interno de los procedimientos de identificación de levaduras al nivel de especie	4
Validación de una nueva metodología	4
Identificación mediante sistemas comerciales	5
Identificación mediante reactivos preparados en el Laboratorio de Microbiología	5
Control de calidad interno de los procedimientos de identificación de hongos filamentosos al nivel de especie	5
Control de calidad interno de los procedimientos para la detección de la resistencia a los antifúngicos	5
Detección de la resistencia mediante sistemas comerciales	5
Control de calidad interno para los procedimientos de detección de la resistencia a los antifúngicos realizados mediante reactivos preparados en el laboratorio para los Métodos de Referencia EUCAST Edis. 7.1, Documento NCCLS M27A2 y Documento NCCLS M38A	6
Control de calidad del medio de cultivo	6
Control de calidad del inóculo	6
Conservación de las cepas de control de calidad	7
Control de calidad de la preparación de las placas	7
Control de calidad interno de las pruebas de detección de anticuerpos frente a hongos patógenos humanos	7
Validación de una nueva metodología	7
Detección de anticuerpos mediante sistemas comerciales	8
Control de calidad interno de las pruebas de detección de antígenos producidos por hongos patógenos humanos	8
Validación de una nueva metodología	8
Detección de antígenos mediante sistemas comerciales	8
Resumen de las recomendaciones	9
Referencias	10
Anexo I. Tablas con las cepas de control de calidad utilizadas en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología	11

Objeto

Los programas de control de calidad aseguran que la información generada por el laboratorio es exacta, adecuada y reproducible. El objeto de las presentes recomendaciones es describir los procedimientos que hay que seguir para realizar el control de calidad interno, de todas las pruebas relacionadas con el diagnóstico de las infecciones causadas por hongos.

Alcance

Los procedimientos se aplicarán a los diferentes ensayos que se realizan para diagnosticar las infecciones fúngicas en los laboratorios de Microbiología.

Personal

Los análisis deben ser realizados por personal técnico cualificado con experiencia en Microbiología.

La supervisión de los análisis y la interpretación de los resultados debe ser realizada por un titulado superior con la especialidad de Microbiología Clínica. Dada las diversas peculiaridades que tiene la Micología Médica es deseable que el personal tenga formación adicional específica en esta materia.

Como norma general es conveniente seguir estos principios:

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

Condiciones ambientales del laboratorio de Micología

Las condiciones ambientales requeridas para desarrollar los ensayos relacionados con la Micología Médica son similares a las de cualquier laboratorio de Microbiología. Sin embargo, existen ciertas peculiaridades que deben reseñarse y que se describen a continuación.

Condiciones de bioseguridad

La inmensa mayoría de los hongos patógenos humanos están clasificados dentro del grupo de riesgo 1 y 2. No obstante, algunas especies, recogidas en la tabla 1, requieren unas condiciones de bioseguridad de nivel 3. Por tanto, todo laboratorio de Microbiología debe disponer de un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad, si realiza aislamiento en muestras clínicas e identificación al nivel de especie de cepas provenientes de pacientes sospechosos de padecer una infección causada por un hongo patógeno del nivel 3 de peligrosidad. Asimismo y como norma general, es conveniente manejar los cultivos de hongos filamentosos dentro de una cabina de bioseguridad para evitar contaminaciones cruzadas dentro del laboratorio.

Programa de limpieza

El programa de limpieza es similar al del laboratorio general de Microbiología. Sin embargo, la limpieza de las poyatas u otras zonas donde se manejen cultivos de hongos se debe realizar con etanol al 70%. Otros desinfectantes no destruyen de forma tan eficaz las esporas.

Las estufas contaminadas se pueden limpiar con Halacid al 1%, bencilbenzoato al 20% o con formalina si está permitido.

Manuales de Procedimientos

- Cualquier técnica realizada en el laboratorio debe tener su manual de procedimiento que tiene que estar disponible de forma permanente para todo el personal.
- Los procedimientos tienen que ser revisados anualmente por el Director del laboratorio.
- Las modificaciones de los procedimientos o la inclusión de nuevos protocolos tienen que ser autorizados por el Director de Laboratorio.

Control de calidad interno de las diferentes tinciones que se utilizan para el examen directo de muestras sospechosas de contener hongos patógenos

El control de calidad de los reactivos que se utilizan para el examen directo de las muestras remitidas al laboratorio para investigación de hongos deberían realizarse con las periodicidades y los métodos seguidamente detallados.

Como norma general, los reactivos deben cambiarse al menos una vez al año y siempre que se observe contaminación macroscópica, alteraciones organolépticas o mal funcionamiento.

Examen en fresco con clarificación por KOH

En el momento de su preparación comprobar su actividad por la capacidad de disolver una porción de muestra de esputo.

En el momento del uso diario hay que realizar un control visual macroscópico de ausencia de precipitados y de contaminación.

Tinción de blanco de calcofluor

Los controles se realizan cada vez que se prepara un lote nuevo de reactivo y cada vez que se realiza la tinción. Utilizar *Candida albicans* en suspensión acuosa para el control positivo y una suspensión en solución salina de *Escherichia coli* para el control negativo.

Tinción de tinta china para la observación de la cápsula polisacárida de Cryptococcus spp.

Cada vez que realicemos la técnica comprobar la esterilidad del reactivo y añadir un control positivo a partir de una suspensión acuosa de *Cryptococcus albidus*.

Tinción con azul de lactofenol

Hay que comprobar la esterilidad del reactivo cada vez que se utilice. Es una tinción que se utiliza con un doble propósito, como tinción y como solución de montaje. Sus componentes actúan matando al hongo pero preservando la estructura al mismo tiempo que se tiñe de azul. No es necesaria la utilización de controles positivos y negativos, es suficiente con comprobar que las estructuras fúngicas se tiñen de color azul

Control de calidad interno de los procedimientos de identificación de levaduras al nivel de especie

Validación de una nueva metodología

Cada nueva metodología que se quiera poner en marcha debe validarse. Si la metodología ha sido aprobada por un organismo nacional o internacional que garantiza su uso, el Laboratorio de Microbiología sólo tiene que demostrar que es capaz de obtener resultados comparables a los obtenidos por el fabricante. En el caso contrario se debe validar completamente comparándola con otras técnicas disponibles ya validadas.

Identificación mediante sistemas comerciales

El Laboratorio de Microbiología debe hacer una revisión exhaustiva de la literatura, especialmente de aquellas fuentes sometidas a revisión por pares antes de decidirse a utilizar un sistema comercial de identificación. Los fabricantes de los sistemas comerciales deben garantizar un exhaustivo control de calidad de sus productos. Asimismo deben facilitar los datos de validación de cada lote al Laboratorio de Microbiología.

El control de calidad de los sistemas comerciales tiene que basarse en las recomendaciones del fabricante.

Se recomienda el control de calidad de cada lote o de cada envío de material, empleando cepas de referencia. Algunos fabricantes recomiendan sus propias cepas de control. En el caso de que no haya recomendación, el Laboratorio de Microbiología puede emplear las que considere adecuadas.

Identificación mediante reactivos preparados en el Laboratorio de Microbiología

La identificación de levaduras mediante reactivos preparados en el propio laboratorio requiere un control interno fiable. Un control básico previo es la demostración de que el reactivo está estéril. Para ello se debe incubar a la temperatura adecuada (35°C y 30°C) una muestra representativa (selección del 5% de forma aleatoria) del lote recién preparado. Si se detecta contaminación de todas las placas utilizadas, se debe hacer otro control. Si el resultado es similar el lote debe descartarse. Asimismo es conveniente ensayar un control positivo y un control negativo en una muestra representativa del lote, aunque en ocasiones es más práctico realizar los controles a la vez que se ensayan las pruebas con el microorganismo problema. En las tablas 2, 3, 4 y 5 se reseñan las cepas que se pueden utilizar como control de calidad de las principales pruebas de identificación, que se realizan con reactivos preparados en el laboratorio. Estas pruebas consisten básicamente en: (i) morfología en agar maíz, (ii) asimilación de fuente de carbono, (iii) asimilación de fuente de nitrógeno, (iv) fermentación de azúcares, (v) producción de ascosporas, y (vi) otras pruebas adicionales.

Control de calidad interno de los procedimientos de identificación de hongos filamentosos al nivel de especie

El control de calidad interno de la identificación de hongos filamentosos es difícil de llevar a cabo. Como es de sobra conocido, la identificación de hongos filamentosos al nivel de especie se sigue realizando mediante la observación macroscópica y microscópica del microorganismo y por tanto, el control de calidad de este proceso es imposible. La única recomendación que se puede realizar es controlar los medios de cultivo de forma sistemática con microorganismos que exhiban las características macroscópicas y microscópicas esperadas. En la tabla 6 se describen las cepas control que se pueden utilizar.

Control de calidad interno de los procedimientos para la detección de la resistencia a los antifúngicos

Detección de la resistencia mediante sistemas comerciales

El Laboratorio de Microbiología debe hacer una revisión exhaustiva de la literatura especialmente de aquellas fuentes sometidas a revisión por pares antes de decidirse a utilizar un sistema comercial de detección de la resistencia a los antifúngicos. Los fabricantes de los sistemas comerciales deben garantizar un exhaustivo control de calidad de sus productos. Asimismo deben de facilitar los datos de validación de cada lote al Laboratorio de Microbiología. El control de calidad de los sistemas comerciales debe basarse en las recomendaciones de los fabricantes.

Se recomienda el control de calidad de cada lote o de cada envío de material empleando las siguientes cepas de referencia: *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258. Asimismo cada día que se realice la prueba se deben emplear estas 2 cepas de control de calidad para verificar el funcionamiento adecuado de la misma. Si se detecta que las CMI's de las cepas no están dentro de los intervalos adecuados más de 1 vez en 20 repeticiones hay que emprender medidas correctoras.

Control de calidad interno para los procedimientos de detección de la resistencia a los antifúngicos realizados mediante reactivos preparados en el laboratorio para los Métodos de Referencia EUCAST Edis. 7.1, Documento NCCLS M27A2 y Documento NCCLS M38A

En este apartado se recoge el control de calidad interno que realiza el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología, para validar los lotes de medio de cultivo y de placas de antifúngicos, siguiendo los protocolos estandarizados del EUCAST y del NCCLS. Como queda recogido más abajo, las placas de antifúngicos sólo se validan con levaduras control ya que se trata de verificar su correcto funcionamiento.

Todos los reactivos que se preparan o se adquieren comercialmente para realizar estas pruebas son inspeccionados visualmente para comprobar que cumplen las especificaciones y no están contaminados.

Control de calidad del medio de cultivo

Debe realizarse cada vez que se preparen el medio de cultivo: RPMI o RPMI-2% glucosa. Se comprueba el pH, la esterilidad y el crecimiento de las cepas control.

- **Control del pH.** Se realiza cada vez que se prepara medio. Se toma una muestra de 5 ml y se pone en un tubo adecuado. Se debe preparar un inóculo siguiendo las instrucciones de los documentos de referencia. En el caso del EUCAST Edis 7.1 el inóculo a utilizar es aproximadamente de 10^5 UFC/ml y en el caso del NCCLS M27A2 es de 10^3 UFC/ml. Para EUCAST Edis. 7.1 el tubo se inocula con 500 µl del inóculo de *C. krusei* ATCC 6258 y se incuba durante 48 horas a 35° C. Al finalizar la incubación se observa el color y se mide el pH.
 - El color debe seguir siendo anaranjado
 - El pH debe ser de $7 \pm 0,5$
- **Control de esterilidad.** Se realiza cada vez que se prepara el medio. Se toma una muestra de 5 ml que se incuba en un tubo adecuado durante 7 días a 35° C. Se comprueba diariamente la existencia o ausencia de contaminaciones.
- **Control de crecimiento.** Se realiza igual que en los apartados anteriores y cada vez que se prepara el medio. Se preparan 2 filas o 24 pocillos de una placa de microdilución de 96 pocillos con 100 µl en cada pocillo del medio de cultivo. Se preparan los inóculos de *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 tal y como se describe en los documentos de referencia. En el caso del EUCAST Edis 7.1 el inóculo a utilizar es aproximadamente de 10^5 UFC/ml y en el caso del NCCLS M27A2 es de 10^3 UFC/ml. Para EUCAST E.dis 7.1 se inoculan 100 µl en una fila de una placa de microdilución o en 12 pocillos, es decir, como son 2 levaduras se inocularán 2 filas o 24 pocillos. La placa se incuba durante 48 h a 35° C. Se lee con el espectrofotómetro a las 24 y a las 48 h y se registran las densidades ópticas que deben estar entre los límites recogidos en la tabla 7.

Si todo es correcto se numera el lote, con fecha de preparación, fecha de caducidad, nombre de la persona que lo ha preparado y se da vía libre a su utilización.

Control de calidad del inóculo

Es recomendable realizar tres controles que se hacen con una periodicidad diferente:

- **Cada día que se realiza la técnica** se introduce el tubo 0,5 de la Escala de McFarland y se anota la densidad óptica, que tiene que coincidir con un intervalo obtenido tras la medida n veces de este control.
- **Mensualmente**
 - Una vez al mes se medirán todos los tubos de la escala de McFarland para comprobar que el espectrofotómetro mide correctamente todas las concentraciones. La escala consta de 5 tubos con turbidez correspondiente a 0,5; 1; 2; 3 y 4
- **Bimensualmente**
 - Una vez cada dos meses se realizará un control del espectrofotómetro de la siguiente forma:
 - Se subcultivan las 8 cepas control (Tabla 8) en placas de chromagar para verificar su pureza. Se preparan 8 inóculos siguiendo las instrucciones del protocolo.
 - Se realizar recuentos del número de UFC de la suspensión original ($1-5 \times 10^6$ UFC/ml) para lo cual se diluye 1:10 cuatro veces consecutivas en agua destilada estéril, y de los tres últimos tubos se siembran 100 μ l en cada una de tres placas de agar Sabouraud (corresponden a 1.000, 100 y 10 colonias respectivamente).
 - Se incuban las placas a 35° C durante 24 h.
 - A las 24 horas se realizan los recuentos de las colonias y se calculan las UFC/ml del inóculo.
 - Se anotan los resultados en la plantilla correspondiente.

Conservación de las cepas de control de calidad

Las cepas control se solicitan a la Colección Americana de Cultivos Tipo y se conservan de forma adecuada entre las que se incluyen:

- Congeladas a -30° C en crioviales comerciales que contienen líquido criogénico y 25 arros de vidrio poroso que facilitan su posterior manipulación.
- Refrigeradas a 4° C en viales con agua destilada estéril.
- Crecidas en tubos de Sabouraud-dextrosa a 4° C. Se subcultivan cada tres meses en Chromagar y Sabouraud para confirmar su pureza y su viabilidad. Normalmente estos son los tubos que se utilizan para subcultivarlas en placas de Sabouraud y realizar la técnica. Si se detecta algún problema se vuelven a sacar de los criotubos.

Control de calidad de la preparación de las placas

Cada vez que se prepara un lote de placas, se realiza un control de calidad interno antes de su utilización con cepas problema. Se inocula una placa de cada uno de los antifúngicos preparados con 8 levaduras ATCC y cuyos valores de sensibilidad conocidos se reflejan en la tabla 8. Si los valores de las CMI obtenidas concuerdan con los anteriores, se puede validar el lote de placas y comenzar a utilizar. Todos los datos obtenidos de estos controles deben anotarse en las correspondientes hojas de registro.

Control de calidad interno de las pruebas de detección de anticuerpos frente a hongos patógenos humanos

Validación de una nueva metodología

Cada nueva metodología que se quiera poner en marcha debe validarse. Si la metodología ha sido aprobada por un organismo nacional o internacional que garantiza su uso, el Laboratorio de Microbiología sólo tiene que demostrar que es capaz de obtener resultados comparables a los obtenidos por el fabricante. En el caso contrario se debe validar completamente comparándola con otras técnicas disponibles ya validadas.

Detección de anticuerpos mediante sistemas comerciales

El Laboratorio de Microbiología debe hacer una revisión exhaustiva de la literatura especialmente de aquellas fuentes sometidas a revisión por pares antes de decidirse a utilizar un sistema comercial de detección de anticuerpos. Los fabricantes de los sistemas comerciales deben garantizar un exhaustivo control de calidad de sus productos. Asimismo deben de facilitar los datos de validación de cada lote al Laboratorio de Microbiología.

El control de calidad de los sistemas comerciales debe basarse en las recomendaciones del fabricante.

Se recomienda el control de calidad de cada lote o de cada envío de material empleando sueros de referencia.

Control de calidad interno de las pruebas de detección de antígenos producidos por hongos patógenos humanos

Validación de una nueva metodología

Cada nueva metodología que se quiera poner en marcha debe validarse. Si la metodología ha sido aprobada por un organismo nacional o internacional que garantiza su uso, el Laboratorio de Microbiología sólo tiene que demostrar que es capaz de obtener resultados comparables a los obtenidos por el fabricante. En el caso contrario se debe validar completamente comparándola con otras técnicas disponibles ya validadas.

Detección de antígenos mediante sistemas comerciales

El Laboratorio de Microbiología debe hacer una revisión exhaustiva de la literatura especialmente de aquellas fuentes sometidas a revisión por pares antes de decidirse a utilizar un sistema comercial de detección de antígenos. Los fabricantes de los sistemas comerciales deben garantizar un exhaustivo control de calidad de sus productos. Asimismo deben de facilitar los datos de validación de cada lote al Laboratorio de Microbiología.

El control de calidad de los sistemas comerciales debe basarse en las recomendaciones del fabricante.

Se recomienda el control de calidad de cada lote o de cada envío de material empleando sueros de referencia.

Resumen de las recomendaciones

1. Los análisis **deben** ser realizados por personal técnico cualificado con experiencia en Microbiología.
2. La supervisión de los análisis y la interpretación de los resultados **debe** ser realizada por un titulado superior con la especialidad de Microbiología Clínica.
3. Las condiciones de Bioseguridad **deben** de ser cumplidas de forma estricta.
4. Cualquier técnica realizada en el laboratorio **debe** tener su manual de procedimiento que tiene que estar disponible de forma permanente para todo el personal.
5. Las tinciones **deben** cambiarse al menos una vez al año y siempre que se observe contaminación macroscópica, alteraciones organolépticas o mal funcionamiento. Para procedimientos más específicos hay que consultar el apartado correspondiente.
6. La utilización de sistemas comerciales **debe** sustentarse en datos objetivos obtenidos de fuentes independientes y bien contrastadas. Los fabricantes **deben** garantizar un exhaustivo control de calidad de sus productos facilitando los datos pertinentes al Laboratorio de Microbiología. El control de calidad de los sistemas comerciales **debe** basarse en las recomendaciones del fabricante.
7. En el tema específico de la detección de la resistencia a los antifúngicos mediante sistemas comerciales hay que resaltar lo siguiente:
 - a. Cada día que se realice la prueba se **deben** emplear *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258 como cepas de control de calidad para verificar el funcionamiento adecuado de la misma.
 - b. Si se detecta que las CMI de las cepas no están dentro de los intervalos adecuados mas de 1 vez en 20 repeticiones se **deben** emprender medidas correctoras.
8. Cuando se utilizan reactivos preparados en el laboratorio los controles de calidad internos **deben** ser muy exhaustivos. Se recomienda la lectura de los apartados correspondientes.

Referencias

1-10

1. **Bartlett, R. C.** 1991. Quality Assurance in the Clinical Microbiology Laboratory, p. 36-43. *In*: A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and Shadomy H.J. (eds.), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D.C.

2. **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gené, and M. J. Figueras.** 2000. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures; Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus.

3. ENAC. Guia para la acreditación de Laboratorios que realizan análisis microbiológicos. ENAC. 3, 1-18. 2002. ENAC.

Ref Type: Report

4. **Kurtzman, C. P. and J. W. Fell.** 1998. The yeasts. A taxonomic study. Elsevier, Amsterdam.

5. **Miller, J. M.** 1991. Quality Control of Media, Reagents, and Stains, p. 1203-1225. *In*: A. Balows, W. J. Hausler, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and Shadomy H.J. (eds.), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D.C.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. 2002. Wayne, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002.

Ref Type: Report

7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. 2002. Wayne, Pa, National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002.

Ref Type: Report

8. **Sewell, D. L. and R. B. Schiffman.** 1995. Quality Assurance: Quality Improvement, Quality Control, and Test Validation, p. 55-66. *In*: P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.), Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D.C.

9. Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Method for determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion Document E dis 7.1. 1, 1-8. 2002. Taufkirchen, Germany, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2003.

Ref Type: Report

10. **Sutton, D. A., Fothergill A.W., and M. G. Rinaldi.** 1998. Guide to clinically significant fungi. William & Wilkins, Baltimore, Maryland.

Anexo I. Tablas con las cepas de control de calidad utilizadas en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología

Tabla 1. Hongos patógenos humanos pertenecientes al grupo 3 de peligrosidad

-
- *Blastomyces dermatitidis*
 - *Cladophialophora bantiana*
 - *Cryptococcus neoformans* var. *grubii**
 - *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans**
 - *Cryptococcus neoformans* var. *gattii**
 - *Coccidioides immitis*
 - *Histoplasma capsulatum*
 - *Paracoccidioides brasiliensis*
 - *Ramichloridium mackenziei*
 - *Emmonsia parva*
-

*Se deben manejar en nivel de contención 3 cuando se realizan experimentos de reproducción sexual donde se generan basidiosporas

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-07

Fecha: 16-05-04 Versión: 1

Realizado por Grupos GEGMIC y MICOMED de la SEIMC

Pág. 12 de 19

Tabla 2. Control de calidad interno para diversas pruebas utilizadas para la identificación de hongos en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología.

Sistema de identificación	Microorganismo	Reacción esperada
Tubos germinales	<i>Candida albicans</i>	Positivo: tubos germinales
	<i>Candida tropicalis</i>	Negativo: sin tubos germinales
Morfología en agar maíz	<i>Candida albicans</i>	Producción de clamidosporas, blastoconidias y pseudohifas en 48 horas
Asimilación de fuente de carbono en discos	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Crecimiento alrededor de todos los discos
Asimilación de nitratos en medio sólido	<i>Pichia anomala</i>	Positivo
	<i>Candida albicans</i>	Negativo
	Sin inocular	Negativo
Hidrólisis de la urea	<i>C. neoformans</i>	Positivo
	<i>Candida albicans</i>	Negativo
	Sin inocular	Negativo
Fenol oxidasa	<i>C. neoformans</i>	Positivo
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Negativo
	Sin inocular	Negativo
Canavanina-glicina-azul de bromotimol	<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	Positivo
	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	Negativo
	Sin inocular	Negativo
Producción ascosporas en diversos agares (V8, Gorodowka, agar extracto de malta, agar acetato, etc)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Positivo
	<i>Pichia anomala</i>	Positivo
	<i>Candida albicans</i>	Negativo

Todos estos controles se deben realizar cuando se reciba o se prepare cada lote. Dependiendo de la frecuencia de uso, puede ser conveniente ensayar un control positivo y negativo cada vez que se realice la prueba.

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-07

Fecha: 16-05-04 Versión: 1

Realizado por Grupos GEGMIC y MICOMED de la SEIMC

Pág. 13 de 19

Tabla 3. Control de calidad interno de la asimilación de fuente de carbono mediante caldos de Wickerhams utilizada en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología.

Fuente de Carbono	Control positivo	Control negativo
Glucosa	<i>Candida albicans</i>	No existe
Galactosa	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
L-sorbosa	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
D-glucosamina	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
D-ribosa	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. lusitaniae</i> CL1844
D-xilosa	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
L-arabinosa	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
D-arabinosa	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
L-ramnosa	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Sacarosa	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Maltosa	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Trealosa	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Celobiosa	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Inulina	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Melibiosa	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Lactosa	<i>C. kefir</i>	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
Rafinosa	<i>Pichia anomala</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Melecitosa	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
Glicerol	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
Eritritol	No disponible	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Adonitol	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
L-arabinitol	<i>Trichosporon mucoides</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
D-sorbitol	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
Dulcitol	<i>C. neoformans</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Inositol	<i>C. neoformans</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
D-gluconato	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i> ATCC 6258
D-glucuronato	<i>C. neoformans</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
DL-lactato	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i> CECT 1078
Citrato	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
Salicilina	<i>Pichia anomala</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-07

Fecha: 16-05-04 Versión: 1

Realizado por Grupos GEGMIC y MICOMED de la SEIMC

Pág. 14 de 19

Tabla 4. Control de calidad interno de la asimilación de fuente de nitrógeno mediante caldos de Wickerhams utilizada en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología.

Fuente de Nitrógeno	Control positivo	Control negativo
Nitrato	<i>Pichia anomala</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Nitrito	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Etilamina	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763
Cadaverina	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030
Creatina	No disponible	<i>C. albicans</i> ATCC 64551
Creatinina	No disponible	<i>C. albicans</i> ATCC 64551

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-07

Fecha: 16-05-04 Versión: 1

Realizado por Grupos GEGMIC y MICOMED de la SEIMC

Pág. 15 de 19

Tabla 5. Control de calidad interno de las pruebas de fermentación de azúcares para la identificación de levaduras utilizada en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología.

Fuente de Nitrógeno	Control positivo	Control negativo
Glucosa	<i>C. tropicalis</i>	
Maltosa	<i>C. tropicalis</i>	
Sacarosa	<i>C. tropicalis</i>	
Lactosa	<i>C. kefyi</i>	<i>C. neoformans</i>
Galactosa	<i>C. tropicalis</i>	
Trealosa	<i>C. tropicalis</i>	
Rafinosa	<i>C. guilliermondii</i>	

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-07

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Realizado por Grupos GEGMIC y MICOMED de la SEIMC

Pág. 16 de 19

Tabla 6. Microorganismos que se utilizan en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología para control interno de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y la identificación de los hongos filamentosos

Medio de cultivo	Microorganismo	Reacción esperada
Agar extracto de malta	<i>Trichophyton rubrum</i>	Esporulación típica
Sabouraud con cicloheximida	<i>Scedosporium apiospermum</i>	Crecimiento abundante
	<i>Scedosporium prolificans</i>	Ausencia de crecimiento
Agar Czapek-Dox	<i>Aspergillus flavus</i>	Color y esporulación típicos
Agar Agua	<i>Alternaria alternata</i>	Esporulación típica
Sabouraud-dextrosa	<i>T. mentagrophytes</i>	Crecimiento abundante
Agar Borelli-Lactrimel	<i>Microsporum canis</i>	Crecimiento abundante y pigmento amarillo
Agar Patata-dextrosa	<i>T. rubrum</i>	Colonia de color rojo
	<i>T. mentagrophytes</i>	Colonia de color marrón
Agar Oat-meal	<i>Chaetomium globosum</i>	Desarrollo de ascosporas
	<i>Phoma glomerata</i>	Desarrollo de conidias
Agar Agua – CIK	<i>Fusarium verticilloides</i>	Esporas en cadenas
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Esporas habituales
Medio dermatofitos	<i>T. mentagrophytes</i>	Crecimiento y cambio de pH
	<i>Rhizopus oryzae</i>	No cambio de pH
Granos de arroz	<i>Microsporum canis</i>	Crecimiento negativo-color marrón
	<i>Microsporum audouinii</i>	Crecimiento positivo-color amarillo
Hidrólisis de la urea	<i>T. mentagrophytes</i>	Positivo
	<i>Trichophyton rubrum</i>	Negativo

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-07

Fecha: 16-05-04 Versión: 1

Realizado por Grupos GEGMIC y MICOMED de la SEIMC

Pág. 17 de 19

Tabla 6 (cont). Microorganismos que se utilizan en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología para control interno de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y la identificación de los hongos filamentosos.

Medio de cultivo	Microorganismo	Reacción esperada
Agares <i>Trichophyton</i>	n° 1 <i>T. mentagrophytes</i>	Crecimiento positivo 4+
	<i>T. tonsurans</i>	Crecimiento ± o positivo 1+
	<i>T. verrucosum</i>	Crecimiento negativo
	n° 2 <i>T. mentagrophytes</i>	Crecimiento positivo 4+
	<i>T. verrucosum</i>	Crecimiento negativo o ±
	n° 3 <i>T. mentagrophytes</i>	Crecimiento positivo 4+
	n° 4 <i>T. mentagrophytes</i>	Crecimiento positivo 4+
	n° 5 <i>T. equinum</i>	Crecimiento positivo 4+
	n° 6 <i>T. megninii</i>	Crecimiento negativo
	<i>Microsporum gallinae</i>	Crecimiento positivo 4+
	n° 7 <i>Microsporum gallinae</i>	Crecimiento positivo 4+

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-07

Fecha: 16-05-04 Versión: 1

Realizado por Grupos GEGMIC y MICOMED de la SEIMC

Pág. 18 de 19

Tabla 7. Intervalo de las densidades ópticas alcanzadas por las cepas de control de calidad

	RPMI 2% glucosa	
	24 horas	48 horas
<i>C. krusei</i> ATCC6258	0,6-1	0,75-1,2
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	0,4-0,8	0,6-1

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

CCI-SEIMC-07

Fecha: 16-05-04 Versión: 1

Realizado por Grupos GEGMIC y MICOMED de la SEIMC

Pág. 19 de 19

Tabla 8. Intervalo (moda \pm 1 dilución) de las CMI's de las cepas de control de calidad interno de las pruebas de sensibilidad empleadas en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología siguiendo la metodología EUCAST.

Especie	AB	5FC	FZ	IZ	VZ	KZ	TB
<i>C. krusei</i> ATCC6258	0,25-1	2-8	16-64	0,015-0,12	0,06-0,25	0,06-0,25	>16
<i>C. albicans</i> ATCC64548	0,06-0,25	0,12-0,5	0,12-0,5	0,015-0,03	\leq 0,015	0,015-0,03	1-4
<i>C. albicans</i> ATCC64550	0,06-0,25	0,25-1	8-32	0,25-1	0,12-0,5	0,12-0,5	>16
<i>C. tropicalis</i> ATCC	1-4	0,12-0,25	32-128	4-16	>8	4-16	1-4
<i>C. glabrata</i> ATCC90030	0,06-0,25	0,12-0,25	4-16	0,12-0,5	0,06-0,25	0,12-0,5	>16
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	0,12-0,5	0,12-0,5	0,5-2	0,03-0,12	0,015-0,06	0,015-0,03	0,03-0,12
<i>C. lusitanae</i> ATCC	0,25-1	0,12-0,5	0,06-0,25	0,015-0,03	\leq 0,015	0,015-0,03	0,06-0,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	0,12-0,5	0,12-0,5	0,5-2	0,03-0,12	0,015-0,06	0,015-0,06	0,03-0,12

CCI-SEIMC-08

Recomendaciones para el Control de Calidad Interno en Parasitología Clínica.

Rafael Borrás Salvador, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario de Valencia, Universidad de Valencia. Avenida Blasco Ibáñez, 17. 46010-Valencia. Correo electrónico: Rafael.Borras@uv.es.

Isabel de Fuentes Corripio, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km 2. 28220-Majadahonda (Madrid). Correo electrónico: ifuentes@isciii.es

CCI-SEIMC-08

Recomendaciones para el Control de Calidad Interno en Parasitología Clínica.

Indice	pág
1 Introducción.....	4
1.1 Objeto y alcance.....	4
1.2 Normas generales.....	4
1.3 Personal.....	4
1.4 El laboratorio de Parasitología Clínica.....	4
1.4.1 Seguridad en el laboratorio.....	4
1.4.2 Equipamiento.....	5
1.4.3 Requerimientos para un adecuado control de calidad interno.....	5
2 Recomendaciones para el control de calidad interno de la fase pre-analítica.....	5
3 Recomendaciones para el control de calidad interno de la fase analítica.....	5
3.1 Control del equipamiento	5
3.1.1 Calibración del microscopio.....	4
3.1.2 Mantenimiento del microscopio.....	6
3.2 Control de los reactivos.....	6
3.3 Control interno de los procedimientos diagnósticos de las parasitosis intestinales.....	7
3.3.1 Control de los exámenes macroscópicos.....	7
3.3.2 Control de las preparaciones húmedas.....	7
3.3.3 Control de las técnicas de concentración.....	7
3.3.4 Control de las tinciones permanentes.....	7
3.3.5 Control de los métodos de detección de antígenos particulados y solubles.....	8
3.3.6 Control del cultivo de nematodos.....	8
3.4 Control interno de los procedimientos diagnósticos de las hemoparasitosis.....	8
3.4.1 Control de la toma de muestras.....	9
3.4.2 Control de las técnicas diagnósticas.....	9
3.4.3 Control del diagnóstico del paludismo.....	10
3.4.4 Control del diagnóstico de las tripanosomiasis.....	11
3.4.5 Control del diagnóstico de las leishmaniasis.....	11
3.4.6 Control del diagnóstico de las filarisis con microfilaremia.....	11
3.5 Control interno de los procedimientos diagnósticos de las parasitosis genito-urinarias	12
3.5.1 Control del diagnóstico de la tricomoniosis.....	12
3.5.2 Control del diagnóstico de la esquistosomosis urinaria.....	12
3.6 Control interno de los procedimientos diagnósticos de la neumocistosis.....	12

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-08

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 3/15

3.7	Control interno de los procedimientos diagnósticos de las parasitosis cutáneo-dérmicas.....	12
3.7.1	Control del procesamiento de las muestras.....	13
3.7.2	Control del diagnóstico de las leishmaniasis cutáneas.....	13
3.7.3	Control del diagnóstico de las filariasis.....	13
3.7.4	Control del diagnóstico de las ectoparasitosis.....	13
4	Resumen	14
5	Bibliografía	15
6	Anexo.....	16

1. Introducción

El diagnóstico parasitológico es fundamentalmente morfométrico y la identificación de los parásitos de modo fiable y exacto, requiere: i) utilizar muestras satisfactorias; ii) preparar y conservar adecuadamente los reactivos; iii) realizar cuidadosamente los procedimientos técnicos seleccionados; iv) examinar meticulosamente las preparaciones realizadas. No obstante, existen procedimientos diagnósticos alternativos, no excluyentes, complementarios de los procedimientos convencionales, y en algunos casos imprescindibles para el diagnóstico, que deben ser controlados por el laboratorio y por lo tanto sujetos a los controles internos de calidad, como son los cultivos específicos (CCI-SEIMC-02), los estudios serológicos (CCI-SEIMC-10) y las técnicas de diagnósticos molecular (CCI-SEIMC-11).

1.1 Objeto y alcance: Estas recomendaciones tienen como finalidad describir como se debe efectuar el control de calidad interno de las técnicas de laboratorio relacionadas con el diagnóstico de las parasitosis humanas. Estos procedimientos se aplicarán a los diferentes ensayos que se realicen en los laboratorios de Microbiología, en relación con su cartera de servicios, encaminados al diagnóstico de las parasitosis humanas.

1.2 Normas generales: En los laboratorios debe existir un supervisor del control de calidad y el personal debe rellenar los registros de control de calidad en los formularios preparados para tal efecto. El supervisor de calidad debe: i) revisar mensualmente los datos generados por el control interno de calidad; ii) clasificar los registros para facilitar su inspección; iii) conservar los registros durante un periodo mínimo de dos años.

1.3 Personal: Los análisis deben ser realizados por personal técnico cualificado con experiencia en Microbiología y Parasitología. La supervisión del proceso diagnóstico y la interpretación de los resultados obtenidos deben ser realizadas por especialistas en Microbiología y Parasitología Médica, **o bien por personal con formación y experiencia reconocidas en el diagnóstico parasitológico**. Dadas las peculiaridades de la Parasitología Clínica, sería aconsejable que el personal tuviese una formación adicional específica en esta materia.

1.4 El laboratorio de Parasitología Clínica: Las características del laboratorio requeridas para realizar el diagnóstico de las parasitosis humanas son similares a las de cualquier laboratorio del área de Microbiología. Debe disponer de programas de seguridad, de limpieza y de eliminación de residuos, que pueden ser los generales del laboratorio, y de los equipos necesarios (microscopios, lupas, centrífugas, refrigeradores, congeladores, incubadores, pH-metros, etc) para realizar los procedimientos diagnósticos de su cartera de servicios. Así como, del correspondiente Manual de Procedimientos de Diagnóstico Parasitológico, que debe de recoger los procedimientos diagnósticos de la cartera de servicios y los correspondientes algoritmos diagnósticos. Sin embargo, existen ciertas peculiaridades que deben ser comentadas:

1.4.1 Seguridad en el laboratorio: El laboratorio debería tener una campana de extracción de gases, o en su defecto debe existir un área bien ventilada, para la manipulación de las muestras fecales conservadas y para la preparación de las muestras para las técnicas de concentración por sedimentación. Los laboratorios que en su cartera de servicios incluyan el aislamiento en cultivo de *Leishmania* spp. y el cultivo de larvas de nematodos intestinales, con el fin de evitar los riesgos de transmisión al personal, deben tener adecuadamente protocolizados los correspondientes procedimientos técnicos.

1.4.2 Equipamiento: El laboratorio debe disponer, de al menos, de un microscopio calibrado para la realización de los estudios morfométricos.

1.4.3 Requerimientos para un adecuado control de calidad interno: Dado que a diferencia de las otras áreas de la especialidad no existen cepas de control, de todas las especies parásitas que afectan al hombre, el laboratorio:

- Debe disponer de una colección propia de muestras fecales conservadas, con los parásitos prevalentes en su área geográfica, adecuadamente identificadas.
- Debe disponer de fuentes documentales propias (libros, atlas) y de acceso on-line, para poder efectuar las consultas pertinentes.
- Debe conservar las preparaciones positivas teñidas con tinciones permanentes.
- Debería disponer de concentrados fecales de parasitosis exóticas en su medio. Así como, de preparaciones permanentes de los principales hemoparásitos, especialmente de las diferentes especies plasmodiales que afectan al hombre, y de las tinciones diferenciales utilizadas en los exámenes coproparasitológicos (Anexo 1).
- El material de referencia (colección de especímenes de helmintos, huevos, larvas y quistes de protozoos preservados en formol; tinciones fecales con ooquistes, quistes y trofozoítos de protozoos y tinciones sanguíneas positivas; atlas; manuales y libros de referencia) debe ser clasificado y almacenado de forma adecuada, de modo de que su consulta con fines diagnósticos, de entrenamiento y adiestramiento, sea fácil.

2. Recomendaciones para el control de calidad interno de la fase pre-analítica

La adecuada programación de la fase pre-analítica es de capital importancia para el buen funcionamiento de los laboratorios clínicos, por ello consideramos que el laboratorio:

- Debería disponer de un "volante de petición propio" en el que, además de los datos demográficos del paciente y del estudio solicitado, debería de estar recogida la información clínica y terapéutica necesarias para la adecuada implementación de la fase analítica, que en el caso del diagnóstico parasitológico debería de incluir, entre otros:
 - Tipo de proceso y tiempo de evolución
 - Datos biológicos concomitantes (vgr. eosinofilia, anemia, etc)
 - Estancia en otros países y otros datos epidemiológicos de interés
- Debe facilitar la información necesaria para la adecuada obtención, conservación y transporte de las muestras, en relación con su cartera de servicios. En el caso de los exámenes coproparasitológicos el laboratorio debe facilitar contenedores con conservantes que permitan la realización de tinciones diferenciales (Manual de Toma de Muestras).

3. Recomendaciones para el control de calidad interno en la fase analítica

3.1 Control del equipamiento: El personal del laboratorio debe controlar el equipamiento del mismo (véase CCI-SEIMC-04), y debe existir constancia de la calibración de al menos uno de los microscopios.

3.1.1 **Calibración del microscopio:** Los estudios morfométricos tienen gran interés en Parasitología Clínica, ya que permiten la adecuada identificación de las especies parásitas. Existen diferentes procedimientos para determinar el tamaño, y sin duda alguna el mejor de ellos consiste en la utilización de un ocular micrométrico. Para la utilización de este instrumento es necesario calibrar previamente el microscopio. Este procedimiento debe realizarse únicamente una vez, y los resultados deben estar expuesto en un lugar visible junto o adheridos al microscopio calibrado.

- **Material necesario**

- Ocular micrométrico: lente ocular que con una escala graduada dividida en 100 divisiones pequeñas.
- Portaobjetos micrométrico: portaobjetos con una escala graduada de 1 mm dividida en porciones de 0,1 mm, que a su vez están divididas en otras de 0,01 mm.

- **Protocolo de calibración**

- Retirar un ocular del microscopio y quitarle la lente superior del mismo.
- Colocar la lente ocular micrométrica en el limitador del campo visual.
- Insertar el ocular en el microscopio.
- Colocar el portaobjetos micrométrico sobre la platina del microscopio.
- Enfocar la escala graduada del portaobjetos micrométrico con el objetivo 10X, y ajustar las escalas del ocular y del portaobjetos hasta que queden paralelas.
- Anotar el número de divisiones del ocular y la medida correspondiente del portaobjetos micrométrico, por ejemplo: 30 divisiones del ocular = 0,45 mm.
- Calcular el valor de una división del ocular, por ejemplo: 30 divisiones del ocular = 0,45 mm, es decir 1 división del ocular = 0,015 mm.
- Convertir el valor obtenido en mm a μm , por ejemplo: 0,015 mm = 15 μm .
- Realizar esta operación para cada objetivo, y anotar los resultados

3.1.2 Mantenimiento del microscopio

- **¿Qué se debe hacer?**

- Mantener el microscopio cubierto con una funda limpia
- Proteger el microscopio de la proliferación de hongos, durante los periodos calurosos y húmedos
- Limpiar el aceite de inmersión con un paño humedecido con etanol-éter (3:7, v/v), y secar la lente con un paño suave, limpio, y sin pelo
- Limpiar los oculares con un paño suave, limpio, y sin pelo

- **¿Qué no se debe hacer?**

- Utilizar el mismo tejido o paño para la limpieza del objetivo de inmersión y de los oculares
- Utilizar alcohol para limpiar las partes pintadas
- Desmontar el microscopio a no ser que se esté capacitado
- Dejar vacíos los orificios de las lentes
- Intercambiar las lentes entre microscopios diferentes

3.2 **Control de los reactivos:** La adecuada preparación y conservación de los reactivos es de capital importancia en el control interno de la fase analítica, por lo cuál:

- En los correspondientes Procedimientos de Diagnóstico Parasitológico debe figurar la composición, preparación, conservación y vida media de los reactivos.
- Todos los reactivos deben estar adecuadamente identificados y en la correspondiente etiqueta deben figurar las fechas de preparación y de caducidad.
- El personal del laboratorio debe comprobar la fecha de caducidad de los reactivos antes de su utilización, y proceder en su caso a su sustitución. El ideal sería que el sistema informático del laboratorio contase con un sistema de control de caducidad.
- Cada vez que se proceda a la sustitución de un reactivo, o se introduzca uno nuevo, debe realizarse el correspondiente control de eficacia.

3.3 Control de los procedimientos diagnósticos de las parasitosis intestinales

Los exámenes coproparasitológicos constituyen el volumen más importante de los procedimientos de diagnóstico parasitológico que son solicitados a los laboratorios de Microbiología, y su realización incluye varias técnicas que deben ser controladas.

- 3.3.1. Control de los exámenes macroscópicos:** Las características macroscópicas de las heces, su consistencia y la presencia de estigmas patológicos, tiene gran interés para la realización de los exámenes coproparasitológicos. En el caso de las muestras conservadas, procedentes de los centros periféricos, los pacientes deben recibir instrucciones, claras y concisas, para que seleccionen la porción fecal idónea y anoten en el contenedor con el conservante, o en una hoja aparte, la consistencia de las heces. Dicha información, debe guardarse en el sistema informático del laboratorio. Cuando se reciban en el laboratorio heces no conservadas, el personal del mismo es quién debe hacer el examen, la conservación y las anotaciones pertinentes.
- 3.3.2. Control de las preparaciones húmedas:** Los exámenes microscópicos directos o tras el proceso de concentración, con solución salina isotónica, solución yodada y/o azul de metileno tamponado, deben estar adecuadamente protocolizados en Manual de Procedimientos de Diagnóstico Parasitológico. La preparación húmeda montada debe tener un grosor tal que permita la lectura de letra pequeña a su través. Los resultados deben quedar reflejados en el sistema informático, con especificación del género y a ser posible de la especie parásita, de las formas observadas, y en el caso de *Blastocystis hominis* con el recuento correspondiente.
- 3.3.3. Control de las técnicas de concentración:** El laboratorio debe de utilizar al menos una técnica de concentración, preferentemente por sedimentación. Siempre que se desee introducir un nuevo procedimiento, tiene que ser comprobada su eficacia utilizando muestras fecales conservadas de la colección del laboratorio. Si el laboratorio utiliza técnicas de concentración por flotación, la densidad de las soluciones empleadas debe ser controlada mensualmente.
- 3.3.4. Control de las tinciones permanentes:** El laboratorio debe comprobar la eficacia diagnóstica de las tinciones permanentes.

- **Tinciones de ooquistes de coccidios intestinales:** Para el control interno de este grupo, en el que se incluyen técnicas de cribado (vgr. Auramina-Rodamina) y de confirmación (vgr. Ziehl-Neelsen modificado), debe comprobarse la eficacia de los diferentes reactivos utilizando frotis fecales positivos para *Cryptosporidium* spp., realizados a partir de la colección de muestras fecales conservadas en el laboratorio, o en su defecto frotis con *Mycobacterium* spp., facilitados por el laboratorio de Micobacterias. Este procedimiento debe realizarse cada vez que se cambie de lote de cada reactivo, y debería realizarse cada vez que se efectúa una tinción.
- **Tinciones diferenciales de amebas:** Para el control interno de este grupo debe comprobarse la eficacia de los diferentes reactivos utilizando frotis fecales positivos, por ejemplo para *Entamoeba coli*, realizados a partir de la colección de muestras fecales conservadas en el laboratorio. Si no se dispone de estas muestras se debe preparar una muestra control añadiendo y mezclando en una muestra de heces, células sanguíneas extraídas del buffy-coat de una muestra de sangre con anticoagulante. Tras el procesamiento de la muestra control se debe comprobar la tinción adecuada de las células sanguíneas. Este procedimiento debe realizarse cada vez que se cambie de lote de cada reactivo, y debería realizarse cada vez que se efectúa una tinción.
- **Tinciones de microsporidios:** Para el control interno de este grupo, en el que se incluyen técnicas de cribado (vgr. Blanco de Calcofluor) y de confirmación (vgr. tinción tricrómica modificada), debe comprobarse la eficacia de los diferentes reactivos utilizando frotis fecales positivos para Microsporidios, realizados a partir de la colección de muestras fecales conservadas en el laboratorio, o en su defecto frotis fecales o de una suspensión que contenga bacterias y levaduras, ya que estas tienen la misma afinidad tintorial que los microsporidios. Este procedimiento debe realizarse cada vez que se cambie de lote de cada reactivo, y debería realizarse cada vez que se efectúa una tinción.

3.3.5. Control de los métodos de detección de antígenos particulados y solubles: Los laboratorios que en su cartera de servicios tengan incluido alguno de estos procedimientos, deben realizar los controles pertinentes siguiendo las instrucciones del fabricante y los resultados deben quedar reflejados en las hojas de trabajo correspondientes.

3.3.6. Control del cultivo de nematodos: Los laboratorios que en su cartera de servicios tengan incluido el cultivo de larvas de nematodos intestinales deben utilizar procedimientos diagnósticos normalizados, aceptados por la comunidad científica. Este procedimiento está sujeto a normas de bioseguridad estrictas, ya que pueden generar larvas filariformes o infectivas.

3.4 Control de los procedimientos diagnósticos de las hemoparasitosis

Diferentes especies de parásitos, tanto protozoos como helmintos, pueden detectarse en alguna fase de su ciclo vital en la sangre. Entre éstos se incluyen diferentes especies de *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Babesia*, *Toxoplasma* y microfilarias. Los diferentes

controles internos se basan en lo expuesto en los apartados generales, pero se señalan en este apartado algunas particularidades específicas.

- 3.4.1 **Control de la toma de muestras:** La muestra de sangre puede tomarse directamente del dedo y proceder a realizar las extensiones rápidamente. En cualquier caso, el laboratorio debe exigir muestras sanguíneas obtenidas por venoclisis con anticoagulante, preferentemente EDTA. La muestra de sangre debe ser identificada, incluyendo la fecha y debería incluir la hora de recogida.
- 3.4.2 **Control de las técnicas diagnósticas.** Las técnicas empleadas y los exámenes microscópicos directos y tras las técnicas de concentración deben estar adecuadamente protocolizados en el Manual de Procedimientos de Diagnóstico Parasitológico. En cualquier caso, el laboratorio debe contemplar: i) la realización de extensiones finas y gruesas, la utilización de métodos de concentración, y de tinciones diferenciales; ii) que los resultados queden adecuadamente reflejados en el sistema informático o libro de registro con especificación del género y de la especie parásita, además de las formas observadas.
- **Control del proceso de las preparaciones sanguíneas:** Se deben realizar dos tipos de preparaciones: i) Extensión fina o frotis fino, para la identificación morfológica del parásito; ii) Extensión gruesa o en gota gruesa, para el diagnóstico de las infecciones pauciparasitarias. Para la realización de las preparaciones de sangre:
 - Se deberían utilizar portaobjetos desengrasados
 - Los portaobjetos deben ser identificados adecuadamente
 - Los frotis sanguíneos se deben dejar secar al aire, horizontalmente y protegidos del polvo e insectos, de 30 minutos a 1 hora. Nunca se debe aplicar calor.
 - **Control en el proceso de tinción.**
 - Cuando se tiene que procesar un número elevado de portaobjetos, éstos deben ser almacenados en contenedores que eviten el contacto con el polvo e insectos.
 - Las extensiones sanguíneas deben ser teñidas lo antes posible tras su preparación, ya que el almacenamiento prolongado puede ir en detrimento de las propiedades de tinción del parásito.
 - Si las preparaciones no pueden ser teñidas en 48 horas, las extensiones finas deben fijarse con metanol y las preparaciones gruesas deben ser sumergidas en agua destilada tamponada y secadas al aire en posición vertical, antes de ser almacenadas. Las preparaciones deberían ser almacenadas a una temperatura por debajo de 27°C, pues el calor afecta a la tinción.
 - La principal tinción utilizada para la observación de los parásitos hemáticos es la tinción por el método de Giemsa. La dilución de trabajo del colorante se debe preparar extemporáneamente, y su eficacia debería ser comprobada. Para la preparación de la dilución de trabajo de Giemsa, y

para el lavado de la tinción, debe emplearse tampón fosfato (pH 6,8-7,2), pues el agua ligeramente alcalina permite apreciar mejor las modificaciones cromáticas de los hematíes y acentúa la tinción del citoplasma de los plasmodios.

- Si se van a teñir un número elevado de preparaciones gruesas se debe cambiar el colorante cada 50 portaobjetos, para evitar el exceso de hemoglobina.
- Para el control interno de las tinciones debe comprobarse la eficacia de los reactivos cada vez que se cambie de lote, el proceso y/o los tiempos de coloración aplicados en la técnica.

- **Control en el examen de las preparaciones**

- Se debe examinar la totalidad de la preparación a bajos aumentos (objetivo 10X), para evitar perder los organismos de mayor tamaño, como las microfilarias.
- Posteriormente se debe examinar la preparación a mayores aumentos y con aceite de inmersión. Antes de emitirse un resultado como negativo, se deben haber observado al menos 100 campos/100X, en el caso de las preparaciones gruesas, y 200 campos/100X en con los frotis finos. Este procedimiento tiene interés para el diagnóstico de las formas pauciparasitarias y para el diagnóstico de las infecciones mixtas.

- **Control de las técnicas de concentración:** Se han descrito diferentes técnicas para el aislamiento y concentración de parásitos hemáticos. El laboratorio debe utilizar al menos una técnica de concentración cuando existe sospecha de parásitos hemáticos y no se han observado en las extensiones fina y gruesa. El control de los diferentes métodos de concentración del "buffy-coat" sanguíneo, frecuentemente utilizados para la detección de *Leishmania* y *Trypanosoma*, se basa en el control de los reactivos, y en la adecuación del procedimiento. En todos los casos, tras el proceso de concentración, se deben preparar extensiones finas para la realización de tinciones diferenciales (vgr. tinción por el método de Giemsa). En el caso de sospecha de tripanosomosis sería conveniente la observación microscópica de preparaciones en fresco de una gota del concentrado. Siempre que se desee introducir un nuevo procedimiento debe comprobarse su eficacia, y se deberían utilizar muestras sanguíneas positivas si se dispone de ellas.

- **Control de los métodos de detección de antígenos de parásitos en sangre o en orina:** Los laboratorios que tengan incluidos algunos de estos procedimientos, deben realizar los controles pertinentes siguiendo las instrucciones del fabricante, y los resultados deben quedar reflejados en las hojas de trabajo correspondientes.

3.4.3 **Control del diagnóstico de Paludismo.** En la sangre se pueden detectar diferentes estadios de *Plasmodium*: merozoitos, trofozoitos jóvenes y maduros, esquizontes inmaduros y maduros, macro y microgametos. El laboratorio debe controlar:

- La obtención de la muestra, siendo de gran interés conocer si la muestra se obtuvo durante un acceso febril o no
- La realización de gota gruesa y de frotis fino, y su tinción por el método de Giemsa o con Naranja de Acridina. Esta última, como técnica de cribado que debe ser confirmada mediante tinción por el método de Giemsa.
- Que la observación microscópica sea realizada por personal cualificado en la identificación de los diferentes estadios evolutivos de las especies plasmodiales
- Los procedimientos de concentración (vgr. método de centrifugación microhematocrito QBC), en el supuesto que estén incluidos en la cartera de servicios
- Que se informe del nivel de la parasitemia (porcentaje de eritrocitos infectados por 100 eritrocitos contados), con la finalidad detectar la posible existencia de resistencias

3.4.4 Control del diagnóstico de las tripanosomiasis: En este caso el laboratorio debe contemplar la realización de:

- Los exámenes microscópicos en fresco, recién obtenida la muestra; así como, de los frotis fino y grueso, y de las correspondientes tinciones diferenciales.
- Un método de concentración (triple-centrifugación, centrifugación con microhematocrito, centrifugación con intercambio iónico) y de los correspondientes estudios morfométricos.
- Aislamiento en cultivo a partir del "buffy-coat", si este procedimiento está incluido en su cartera de servicio

3.4.5 Control del diagnóstico de la leishmaniosis: Normalmente es baja la parasitemia originada por *Leishmania* por lo que el laboratorio debe controlar:

- La obtención del buffy-coat por las técnicas de concentración (vgr. concentración en gradiente) y posterior tinción por el método de Giemsa
- La realización de los cultivos a partir del "buffy-coat", si este procedimiento está incluido en su cartera de servicio

3.4.6 Control del diagnóstico de filariasis con microfilaremia: Además de conocer la procedencia o estancia del paciente en determinadas áreas geográficas, dada la periodicidad presentada por algunas especies de filarias se debe controlar la hora de la toma de sangre. Se debería realizar una toma de sangre a medio día y otra por la noche para poder detectar microfilarias de diferente periodicidad. Con las muestras el laboratorio debe:

- Realizar exámenes microscópicos en fresco y extensiones finas y gruesas que deben ser teñidas por el método de Giemsa.
- Utilizar un método de concentración, (vgr. centrifugación en gradientes, técnica de filtración).

- Efectuar la diferenciación de las especies parásitas utilizando tinciones diferenciales (hematoxilina de Delafield; histoquímicas).
- Informar del recuento de microfilarias por unidad de volumen, con la finalidad de evitar la aparición de reacciones medicamentosas adversas cuando se inicia el tratamiento en los pacientes con microfilaremia elevada.

3.5 Control de los procedimientos diagnósticos de las parasitosis genito-urinarias:

3.5.1 Control del diagnóstico de la tricomoniosis

- Si la muestra es obtenida por personal del laboratorio se deben realizar exámenes microscópicos en fresco, y si en ese momento no es posible, o la observación microscópica es negativa, se debe proceder a la realización de frotis para tinciones permanentes (tinción por el método de Giemsa o Naranja de Acridina), y debería incluirse el cultivo en los medios adecuados.
- Si la muestra es remitida al laboratorio en medio de transporte, el procedimiento diagnóstico debe incluir el cultivo.
- Los laboratorios que en su cartera de servicios tengan incluidas técnicas de detección de antígenos, deben realizar los controles pertinentes siguiendo las instrucciones del fabricante y los resultados deben quedar reflejados en las hojas de trabajo correspondientes

3.5.2 Control del diagnóstico de la esquistosomosis urinaria: Los laboratorios que tienen incluida esta determinación en su cartera de servicios, deben de especificar las condiciones de obtención y de conservación de las muestras, así como:

- Tener protocolizado el procedimiento diagnóstico: sedimentación y/o filtración
- Informar cuando la observación microscópica haya sido positiva, sobre el número de huevos por unidad e volumen y sobre su viabilidad.

3.6 Control de los procedimientos diagnósticos de la neumocistosis

Los laboratorios que tienen incluida esta determinación en su cartera de servicios deben tener protocolizado el proceder diagnóstico, que debe incluir: i) preparación de la muestra; ii) tinciones diferenciales, inmunológicas o convencionales.

- Aquellos laboratorios que utilicen técnicas convencionales de cribado (vgr. Blanco de Calcofluor) y/o confirmación (vgr. Azul de Toluidina O), sino disponen de controles internos de *Pneumocystis jiroveci* pueden utilizar para tal fin frotis con levaduras, ya que estos organismos tienen la misma afinidad tintorial que las levaduras. Este procedimiento debe realizarse cada vez que se cambien los reactivos, y debería realizarse cada vez que se efectúa una tinción.
- Los laboratorios que disponen de técnicas de inmunofluorescencia deben de seguir las instrucciones del fabricante e introducir los controles internos correspondientes.

3.7 Control de los procedimientos diagnósticos de las parasitosis cutáneo-dérmicas

Se realiza principalmente en parasitosis tales como las originadas por *Leishmania spp*, *Acanthamoeba spp* (amebiasis primaria), *Entamoeba histolytica* (amebiosis secundaria), microfilarias de *Onchocerca volvulus* y *Mansonella streptocerca*. Las muestras tisulares para la detección de parásitos pueden ser enviadas al laboratorio de diversas formas (biopsias fijadas o no fijadas), y se debe controlar especialmente la adecuada toma de muestra, y las condiciones de conservación y transporte.

- 3.7.1 **Control del procesamiento de las muestras:** Es de capital importancia que esté adecuadamente protocolizado el procesamiento de biopsias frescas, para la realización de las extensiones (improntas, frotis, homogeneización), de las tinciones y de los exámenes microscópicos, de los cultivos o las inoculaciones en animales de experimentación. Así como, el procesamiento fijadas para los estudios histopatológicos.
- 3.7.2 **Control del diagnóstico de la leishmaniosis cutánea:** El laboratorio debería especificar el procedimiento de obtención de muestras que prefiere. Uno de los recomendados consiste en la utilización de un "punch" de toma de muestras de 5mm. Independientemente del modo obtención de la muestra:
- o La muestra debe ser procesada rápidamente, haciendo improntas y tiñendo las preparaciones con la tinción de Giemsa.
 - o Si el laboratorio tiene incluida en la cartera de servicios la técnica de aislamiento en medios de cultivo, se debe proceder a la trituración y posterior inoculación del medio seleccionado.
- 3.7.3. **Control del diagnóstico de filariasis:** Estos procedimientos están encaminados para el diagnóstico de la parasitación por *O. volvulus* y *M. streptocerca*, mediante la detección de microfilarias en muestras dérmicas.
- o La obtención de la muestra debería realizarse en el laboratorio, preferentemente con un "punch" ya que permite la obtención de muestras exangües, de tamaño y peso uniformes.
 - o Se debe controlar el desarrollo correcto del protocolo de la técnica de incubación de la muestra con solución salina a temperatura ambiente, con el subsiguiente seguimiento y posterior tinción permanente de las microfilarias para la identificación morfológica y la confrontación con preparaciones positivas de la colección de referencia.
- 3.7.4. **Control del diagnóstico de las ectoparasitosis:** En el laboratorio se pueden recibir artrópodos para su identificación, procedentes de diversas localizaciones anatómicas del paciente o de origen desconocido (encontrados en el domicilio, etc.). El laboratorio debe tener protocolizados su observación con lupa estereoscópica y su conservación y montaje, si la observación directa no ha sido diagnóstica. Si la identificación no es posible realizarla en el laboratorio, el espécimen debería ser remitido, adecuadamente conservado, a un centro de referencia.

4. Resumen

El laboratorio debe:	El laboratorio de debería:
Disponer de personal técnico con experiencia en el diagnóstico microbiológico	-
Disponer de Especialistas en Microbiología y Parasitología	-
Disponer de Programas Seguridad y de Limpieza y Eliminación de Residuos	-
Disponer de un Manual de Toma de Muestras	Disponer de un volante de petición propio
Disponer del correspondiente Manual de Procedimientos de Diagnóstico Parasitológico	-
Disponer del equipamiento necesario para realizar los procedimientos diagnósticos de su cartera de servicios	
Disponer de un área bien ventilada	Disponer de una cabina de aspiración de gases
Controlar el adecuado funcionamiento del equipamiento	-
Disponer de un microscopio calibrado con el resultado de la calibración bien visible	-
Controlar la adecuada obtención de las muestras, su conservación, transporte, e identificación.	
Disponer de una colección de muestras fecales conservadas con parásitos de su área geográfica	-
Disponer de fuentes documentales propias y acceso on-line	-
Conservar las preparaciones permanentes positivas	-
-	Disponer de concentrados fecales de parasitosis exóticas
-	Disponer de preparaciones permanentes de los principales hemoparásitos y , en su caso, de las tinciones diferenciales de protozoos intestinales recogidas en la cartera de servicios
Tener adecuadamente identificados los reactivos	-
Controlar la caducidad de los reactivos	
Controlar la eficacia de los reactivos recién preparados o de nueva introducción	-
Efectuar examen macroscópico de las muestras fecales	-
Controlar la eficacia de las técnicas de concentración	-
Controlar la eficacia de las tinciones diferenciales utilizando los controles internos pertinentes, si los hubiese	-
Controlar la eficacia de los métodos de detección	-

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica
CCI-SEIMC-08

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 15/15

de antígenos particulados y solubles	
Efectuar siempre extensiones sanguíneas fina y gruesa de cada muestra, y observar esta en el supuesto que el frotis fino fuese negativo	Realizar siempre un método de concentración de parásitos hemáticos cuando los procedimientos convencionales fuesen negativos
Controlar el examen de un número adecuado de campos en las preparaciones teñidas	-
	Informar del nivel de parasitemia (recuento de <i>Plasmodium, microfilarias</i>)
	Obtener las muestras cutáneas con dispositivos que garanticen toma de muestras uniformes
Reflejar adecuadamente los resultados en el sistema informático o libro de registro	-
Efectuar la identificación, en el caso del paludismo, a especie parásita y los estadios observados	Efectuar, en el resto de las parasitosis, la identificación a nivel de especie, especificando el carácter patógeno o comensal de la misma

6. Bibliografía

7. Anexo

Recomendaciones para el control de calidad interno en virología clínica

Núria Rabella

Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.
Avda. S.A.M. Claret 167. 08025 Barcelona

Introducción

El control de calidad consiste en una serie de procedimientos diseñados para asegurar que los resultados del laboratorio son correctos y reproducibles. Un minucioso control de calidad puede ayudar a mejorar tanto el tiempo de respuesta como la relación coste-beneficio reduciendo la necesidad de pruebas repetidas, la repetición de la recogida de la muestra y eliminando los errores que resultan en un diagnóstico equivocado o un tratamiento inapropiado.

Los procedimientos de control de calidad deberían ser realizados y documentados tal como requiere la autorización administrativa del laboratorio. La política de calidad debería reflejar los requisitos locales, autonómicos y estatales.

Mientras los procedimientos juegan un papel en la producción de un diagnóstico adecuado, la clave del éxito de un servicio de virología clínica es la calidad de su personal. La selección del personal, la formación, la evaluación y la formación continuada son críticas en el funcionamiento del laboratorio. Finalmente, la buena comunicación entre el virólogo clínico y el personal médico que atiende al paciente influye grandemente en la consecución del objetivo de la calidad.

Objeto

El objeto de las presentes recomendaciones es describir los procedimientos que se deberían seguir para realizar el control de calidad interno de todas las pruebas relacionadas con el diagnóstico de las infecciones causadas por virus.

Alcance

Los procedimientos se aplicarán a los diferentes ensayos que se realizan para diagnosticar las infecciones víricas en los laboratorios de Microbiología.

Personal

Los análisis deben ser realizados por personal técnico cualificado. Dada las diversas peculiaridades que tiene la Virología Clínica es deseable que el personal tenga formación adicional específica en esta materia.

La supervisión de los análisis y la interpretación de los resultados debe ser realizada por un titulado superior con la especialidad de Microbiología Clínica.

Como norma general es conveniente seguir estos principios:

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

Condiciones ambientales del laboratorio de Virología

Las condiciones ambientales requeridas para desarrollar los ensayos relacionados con la Virología Clínica son similares a las de cualquier laboratorio de Microbiología. Sin embargo, existen ciertas peculiaridades que deben reseñarse y que se describen a continuación.

Manuales de Procedimientos

- Cualquier técnica realizada en el laboratorio debe tener su manual de procedimiento que tiene que estar disponible de forma permanente para todo el personal
- Los procedimientos tienen que ser revisados anualmente por el Director del laboratorio

- Las modificaciones de los procedimientos o la inclusión de nuevos protocolos tienen que ser autorizados por el Director de Laboratorio

Control de calidad interno de los reactivos y materiales para cultivo celular.

Los reactivos y otros suministros pueden ser fuente de contaminaciones microbianas, toxicidad para los cultivos celulares e interferencia en la recuperación de algunos virus.

Registros

Mantener registros para cada lote de medio o de reactivo. Incluir la fecha de recepción, preparación, de caducidad, número del lote de los componentes, esterilidad, pH, resultados de las pruebas de toxicidad, y cualquier acción correctiva que haya sido necesaria. Estos registros se usan para trazar el origen de cualquier toxicidad, contaminación, o interferencia detectada con un lote de reactivo en particular. Los reactivos deberían rotularse con la fecha de caducidad y la de apertura (primera utilización).

Contaminantes microbianos:

Bacterias y hongos: Realizar controles de esterilidad de todos los medios, sueros, y tampones utilizados para el cultivo celular. Es recomendable comprobar todos los componentes individualmente antes de incorporarlos al producto final. Cuando aparece una contaminación la comprobación e identificación de todos los componentes es de ayuda para seguir el trazado de la causa de la contaminación. Si la fuente de la contaminación no puede ser identificada es más rentable destruir todos los medios sospechosos y revisar nuevamente con el personal la realización aséptica de la técnica. Asegurar el mantenimiento de la esterilidad mediante la adherencia estricta a la realización aséptica de la técnica, incluyendo el uso de material estéril. La utilización de volúmenes pequeños, por ejemplo para menos de una semana, es preferible para reducir el riesgo de contaminación que comporta manejar repetidamente volúmenes grandes.

Micoplasmas: El suero bovino fetal y otros sueros pueden contener diferentes especies de micoplasmas que pueden infectar las líneas celulares. La mejor opción es comprar suero libre de micoplasmas

Virus: El suero bovino fetal y otros sueros pueden estar contaminados por diferentes virus. Es aconsejable comprar sueros y reactivos en los que se ha descartado la existencia de estos virus. Algunos proveedores utilizan filtros o rayos gamma para inactivar virus.

Toxicidad

Las fuentes de toxicidad para los cultivos celulares incluyen los siguientes. Concentraciones elevadas de antimicrobianos, contacto con ciertos productos de caucho, plástico y selladores usados en tubos y tapones, fotoproductos de la riboflavina y el triptófano, niveles de endotoxinas bacterianas superiores a 1ng/mL en el agua o en el suero, el mango de los escobillones de madera, ciertos lotes de dacron, algodón, y escobillones de alginato de calcio, residuos de detergentes u otros productos químicos en el material fungible provenientes del lavado o de la esterilización. Es recomendable hacer una prueba previa del medio de transporte y los medios de cultivo para descartar la toxicidad para las células.

Agua: Utilizar agua de la máxima calidad posible. Se puede adquirir comercialmente. En caso de utilizar agua del propio laboratorio se puede asegurar su calidad Monitorizar diariamente el pH y la resistividad y semanalmente es aconsejable el recuento de colonias bacterianas debido a la toxicidad que resulta de la presencia de niveles bajos de endotoxinas y otras sustancias. Deben mantenerse niveles de resistividad inferiores a 10 MΩ y recuentos bacterianos menores a 10 colonias por mL. Agua libre de pirógenos para cultivo celular se obtiene a partir de una desionización seguida por una ultrafiltración.

Evitar el almacenamiento de agua purificada antes de su esterilización ya que puede haber multiplicación de *Pseudomonas*. Filtración con filtros de poros de 0,22µm es mejor cuanto más cerca de la válvula de salida.

Inhibidores víricos

El suero, incluido el suero bovino fetal, puede contener inhibidores víricos termoestables o termolábiles: inhibidores termolábiles que pueden actuar si no se consigue y mantiene la temperatura necesaria para su inactivación (30' a 56°C). Los inhibidores termoestables incluyen los anticuerpos. Algunos lotes de suero bovino fetal pueden causar la inhibición del aislamiento de los virus de la gripe y de las clamidias. Antes de su utilización cada nuevo lote de suero debe ser controlado para los virus que rutinariamente se aíslan en el laboratorio. Los inhibidores pueden interferir no solo en el aislamiento sino también en la detección de antígeno cuando el suero está incluido en el medio de transporte.

No deben utilizarse escobillones con alginato cálcico para la recogida de las muestras. Se ha demostrado que inactivan los virus herpes simple y las clamidias.

Control de calidad interno de los cultivos celulares

La comprobación de cada lote de cultivo celular antes de su uso en el diagnóstico es imposible ya que el mayor rendimiento de las líneas celulares se consigue en aquellas que han sufrido pocos pases y cuando se utilizan para la inoculación en un máximo de 10 días después de su siembra o una semana después de su recepción. Por lo tanto el control de calidad se realiza en paralelo con los cultivos de las muestras. Las muestras vuelven a inocularse utilizando nuevas células cuando se detectan lotes defectuosos. Estrategias como compartir con otro laboratorio y la utilización de dos o más proveedores minimizan las pérdidas debidas a los problemas en el suministro de las células. Las siguientes recomendaciones para el control de la calidad se refieren a células comercialmente preparadas pero también son aplicables a las células preparadas en el laboratorio.

En términos generales se debería hacer una valoración inicial y el registro de los datos obtenidos. Es recomendable la utilización de controles de acuerdo a las necesidades del laboratorio.

- Seleccionar controles negativos (no inoculados) para cada lote de células. Incubar, observar, cambiar el medio en paralelo con los tubos inoculados para monitorizar la calidad de las monocapas y proveer la base para la comparación de los cultivos inoculados en todos los procedimientos de detección vírica (ECP, hemadsorción, inmunodetección,.)
- Además se seleccionaran dos o tres controles negativos (no abiertos) de cada lote de línea celular para identificar posibles problemas de toxicidad y contaminación cuyo origen sea del proveedor o del laboratorio en el momento de la preparación. Incubar y observar (1 semana), pero no abrir estos tubos.

- Preparar tantos controles positivos (inoculados con diferentes virus) como sean necesarios con cepas de referencia que sean representativas de los aislamientos esperados o alternativamente con cepas aisladas y caracterizadas en el laboratorio. Ya que los datos obtenidos de los controles positivos raramente serán disponibles antes del momento adecuado de utilización del cultivo celular. Este tipo de controles no se utilizan para controlar cada lote. Sin embargo, ciertas condiciones obligan a su utilización:
 - Bajo porcentaje de aislamientos
 - Comparación de diferentes tipos celulares o ensayos
 - Técnicos inexpertos
 - Cambio de proveedor
 - Fallos en los programas externos de calidad
 - Problemas repetidos con los controles negativos (destrucción acelerada, etc.)

Deberían mantenerse registros de control de calidad de todos los lotes de cultivo celular para establecer la necesidad de repetir inoculaciones de muestras, obtener reenvíos de células y cambiar de proveedores o líneas celulares. Así mismo también debería haber un registro de la esterilidad, la confluencia, las acciones correctoras, y los resultados de hemadsorción cuando corresponda.

Para los cultivos inoculados con muestras registrar la fecha de inoculación y número de lote, pases, cambios de medio y otras manipulaciones

Contaminaciones

Las células compradas a proveedores externos deben estar certificadas como libres de contaminación por bacterias, micoplasmas y hongos. En algunas ocasiones se reciben cultivos comerciales contaminados. También en el laboratorio la contaminación puede tener lugar en múltiples ocasiones.

Bacteriana y fúngica: La contaminación es inevitable en los cultivos celulares y puede tener su origen en múltiples fuentes, incluyendo los reactivos contaminados, fallos en la técnica, o las muestras no estériles de los pacientes. Un buen programa de control de calidad, una adecuada formación del personal y los procedimientos bien documentados permiten una eficiente respuesta y minimizan el número de cultivos repetidos y muestras recogidas de nuevo. Las prácticas que minimizan el riesgo de contaminación incluyen las siguientes:

-Utilización de una técnica aséptica estricta

-Utilizar cabinas de seguridad biológica de clase II con filtro HEPA para manipular las muestras de los pacientes y las cepas y su procesamiento en cultivos celulares

-Antes y después de cada uso limpiar todas las superficies con etanol 70% u otro potente desinfectante como glutaraldehído alcalino al 2%. Aunque el hipoclorito sódico al 0,5% es bueno para la descontaminación, puede corroer las superficies de acero inoxidable

-No introducir en la campana demasiados objetos que impidan la libre circulación del flujo laminar. Verificar la velocidad del aire regularmente

-Certificar el buen funcionamiento de la campana de seguridad biológica cada seis meses

-Se recomienda usar cabinas separadas para cambiar los medios de los cultivos no inoculados y los inoculados.

-Si se utiliza una sola campana, el trabajo con los tubos no inoculados debe preceder al de las muestras y las cepas con un paso de descontaminación entre ambos procedimientos.

Micoplasmas: La contaminación por micoplasmas de los cultivos celulares puede no ser aparente mediante la evaluación macroscópica y microscópica rutinaria y sin embargo interferir en la calidad y viabilidad de los cultivos celulares propagados en serie

Debe obtenerse confirmación por parte del proveedor de que las líneas celulares adquiridas han sido monitorizadas para la presencia de micoplasmas

La contaminación de las líneas celulares mantenidas seriadamente en el laboratorio puede ocurrir de diversas fuentes, incluyendo el suero y la tripsina. Es conveniente monitorizar las líneas celulares para la contaminación con micoplasma o bien sustituirlas por lotes nuevos cada seis meses

Virus: Los cultivos celulares pueden estar contaminados por virus endógenos, los cuales interfieren en el aislamiento vírico, pueden confundirse con un aislamiento verdadero o pueden representar un riesgo biológico. Aunque los virus endógenos no están limitados a las células de primates, la contaminación de los cultivos celulares con virus está mayoritariamente asociada a estas células. Las células de riñón de mono primarias están contaminadas frecuentemente con virus endógenos, algunos de los cuales pueden detectarse mediante la técnica de hemadsorción o por el efecto citopático. La contaminación vírica exógena, incluyendo la contaminación cruzada de los cultivos, puede ocurrir como consecuencia de la utilización de material contaminado o bien de la práctica poco cuidadosa. La contaminación cruzada de los cultivos puede llevar a informar resultados falsamente positivos.

Por otro lado las precauciones descritas anteriormente para minimizar la contaminación bacteriana y fúngica también reducen el riesgo de la contaminación cruzada:

-Usar pipetas estériles diferentes para cada muestra y evitar la contaminación de los aparatos de pipeteo

-La utilización de placas aumenta el riesgo de todos los tipos de contaminación. -Hay que ejercer un cuidado especial para evitar salpicaduras y los aerosoles.

Sensibilidad

Cuando se sospeche la presencia de problemas de sensibilidad se deberían buscar nuevas fuentes de obtención de células. Alternativamente pueden realizarse pruebas semicuantitativas. Para ello se realiza la inoculación de diluciones seriadas de cepas conocidas que demostraran las diferencias de sensibilidad de hasta cien veces entre las células obtenidas de las diferentes fuentes. Asimismo los cultivos celulares pueden mostrar diferencias en la sensibilidad de cada lote.

Control de calidad interno de los reactivos utilizados para la identificación de los aislamientos

Estos principios se aplican a cada lote y equipo de reactivos para la detección e identificación de los virus aislados en los cultivos celulares.

- Mantener una lista-inventario. Rotular los reactivos con la fecha de llegada y la de caducidad. Anotar toda aquella información pertinente, incluyendo el número de lote, la fecha de recepción, temperatura y condiciones de transporte y fecha de caducidad.
- Notificar al vendedor y devolver los reactivos transportados de forma no apropiada (p.e. temperatura equivocada)
- No utilizar reactivos caducados o deteriorados
- Rotular con las iniciales y la fecha todos los equipos en uso
- Probar los nuevos lotes utilizando controles negativos y positivos
- Una sola prueba en paralelo con controles cualitativos puede no ser adecuada para detectar pequeñas variaciones entre lotes tales como el aumento de las reacciones inespecíficas como una ligera disminución de la sensibilidad. Siempre que sea posible es preferible la utilización de controles semicuantitativos
- Cuando corresponda incluir también controles heterólogos al probar nuevos lotes de antisueros para identificar reacciones cruzadas entre virus relacionados.
- Incluir controles positivos y negativos. Es aconsejable utilizar positivos de título alto y bajo
- Titular los antisueros para determinar la dilución óptima para las pruebas de neutralización y los inmunoanálisis. Los resultados más satisfactorios se obtienen mediante la titulación en tablero de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los inmunoanálisis. Con los reactivos de inmunofluorescencia esta titulación debe leerse en el microscopio utilizado para la lectura de las muestras
- Utilizar tubos y shell-viales infectados con cepas conocidas como controles positivos para la detección vírica y los métodos de identificación. Los controles preparados en paralelo con las muestras de los pacientes son preferibles a los almacenados o a las preparaciones de control comerciales. Éstos solo permiten comprobar el paso final de la técnica pero no otras variables como la centrifugación, la incubación y la fijación.

Validación de una nueva metodología

Cada nueva metodología que se quiera poner en marcha debe validarse. Si la metodología ha sido aprobada por un organismo nacional o internacional que garantiza su uso, el Laboratorio de Microbiología sólo tiene que demostrar que es capaz de obtener resultados comparables a los obtenidos por el fabricante. En el caso contrario se debe validar completamente comparándola con otras técnicas disponibles ya validadas.

CCI-SEIMC-10

RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN SEROLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

María Jesús Alcaraz Soriano

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia.

Teléfono: 96.3987515

mjalcaraz@hotmail.com

José Luis Pérez Saénz

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca.

Teléfono: 971.175185

jlperrez@hsd.es

ÍNDICE

1. - Objeto
2. - Alcance
3. - Personal
4. - Condiciones ambientales del laboratorio de Serología
 - 4.1.- Condiciones de bioseguridad
 - 4.2.- Gestión de residuos
 - 4.3.- Programa de limpieza
5. - Manuales de procedimientos
6. - Control de calidad interno en Serología en la fase preanalítica
 - 6.1.- Condiciones de las muestras clínicas
 - 6.2.- Condiciones de aceptación o rechazo de las muestras
 - 6.3.- Preparación y conservación de las muestras
 - 6.4.- Conservación, almacenamiento e utilización de los reactivos
 - 6.5.- Evaluación preanalítica de las pruebas diagnósticas
 - 6.6.- Adecuación clínica de las pruebas diagnósticas (algoritmos diagnósticos y perfiles)
 - 6.7.- Control del laboratorio de referencia
- 7.- Control de calidad interno en Serología en la fase analítica
 - 7.1.- Realización de los ensayos
 - 7.2.- Validación técnica
 - 7.3.- Monitorización de los ensayos y control de lotes
8. - Control de calidad interno en Serología en la fase postanalítica
 - 8.1.- Validación clínica y facultativa
 - 8.2.- Diseño y edición del informe
9. - Métodos estadísticos de control interno para control de tendencias
 - 9.1.- Fundamentos y aplicación
 - 9.2.- Cuándo se deben aplicar métodos de control estadístico
 - 9.3.- Cómo se lleva a cabo el control estadístico
 - 9.4.- Invalidación de un ensayo mediante las reglas de Westgard
 - 9.5.- Valores que obligan a la revisión del ensayo
- 10.- Control, verificación y mantenimiento del instrumental y equipos específicos de Serología.
 - 10.1.- Pipetas automáticas
 - 10.2.- Lectores de ELISA en microplaca
 - 10.3.- Lavadores de microplaca
 - 10.4.- Sistemas robotizados y autoanalizadores
- 11.- Referencias
- 12.- Resumen de normas y recomendaciones
 - 12.1.- Normas y aspectos de cumplimiento obligado
 - 12.2.- Procesos recomendables

1. – OBJETO

El objeto de éste capítulo es el establecimiento de unas recomendaciones de consenso para asegurar la calidad interna de todos los procesos y procedimientos implicados en el diagnóstico serológico de las enfermedades infecciosas, tanto en lo que se refiere a la fase preanalítica, analítica como postanalítica. Se describen recomendaciones en los procedimientos a seguir para realizar el control de calidad interno de las pruebas o ensayos serológicos. El objetivo último es garantizar la calidad de los resultados o diagnósticos emitidos por el laboratorio de serología consiguiendo, de esta forma, alcanzar la satisfacción de los clientes.

2. – ALCANCE

Los procedimientos se deben aplicar en todos los laboratorios de Microbiología Clínica en los que realicen pruebas o ensayos serológicos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y en todas las etapas del proceso analítico.

3. – PERSONAL

Todas las actividades o tareas directamente implicadas en el diagnóstico serológico, tanto analíticas como preanalíticas y postanalíticas, deben ser realizadas por personal de enfermería y/o técnico cualificado y con capacitación en este campo de la Microbiología Clínica.

El personal técnico del laboratorio de Serología debe ser responsable de tener actualizados los registros de control de Calidad en Serología en los formatos apropiados.

La supervisión de las pruebas o ensayos, la validación facultativa y la interpretación de los resultados debe ser realizada por un titulado superior con la especialidad de Microbiología Clínica.

Como norma general, el laboratorio de Serología debería, además de disponer del archivo de personal, (en el que se recogen su curriculum vitae, formación/experiencia y descripción del puesto de trabajo), implantar un procedimiento de formación continuada del personal en ésta área del diagnóstico serológico y mantener actualizados los registros de formación del personal.

La revisión y evaluación de los datos y resultados generados por el Control de Calidad Interno de Serología debe ser responsabilidad del director o supervisor de la Calidad del laboratorio de Microbiología. Además, debe ser el responsable del mantenimiento de los registros de la Calidad de forma organizada y de facilitar su acceso e inspección, durante un periodo de al menos 2 años.

4. – CONDICIONES AMBIENTALES DEL LABORATORIO DE SEROLOGÍA

Se debe hacer referencia a las condiciones ambientales que deben cumplir los locales e instalaciones del laboratorio de Serología, que inciden en la seguridad y salud de del personal, y son similares a los de cualquier laboratorio de Microbiología Clínica. Estas condiciones o requisitos están esbozados en los decretos de Autorización de los Laboratorios Clínicos de las distintas Comunidades Autónomas, o en cualquier norma legal con aplicación en este ámbito (normas ISO9001/2000, EN-ISO15189).

4.1.- Condiciones de bioseguridad

El laboratorio de Serología debe cumplir las condiciones o normas establecidas y recogidas en el Manual de Seguridad del laboratorio de Microbiología Clínica, donde se definen los riesgos y se describe de forma detallada las medidas de control esenciales para la protección del personal de los riesgos biológicos, físicos y químicos.

La mayoría de las pruebas serológicas se realizan con muestras clínicas cuyos agentes biológicos están clasificados en los grupos de riesgo 2 y 3, por ejemplo, los virus de las hepatitis B, C, D, el virus de la inmunodeficiencia humana, etc.), por lo que se deben aplicar las medidas de contención apropiadas al nivel de riesgo. En éste campo se deberían seguir las directrices establecidas por la SEIMC en el protocolo publicado sobre Seguridad y riesgo biológico en Microbiología, y siempre se deben cumplir todas las prescripciones legales específicas (RD 664/97, por ejemplo).

4.2.- Gestión de residuos

Representa un aspecto importante de las condiciones de bioseguridad del laboratorio de Microbiología, el cual, debe elaborar un protocolo o Manual de gestión de los residuos (infecciosos, químicos, etc.) siguiendo las directrices generales contenidas en el Plan de residuos del hospital o institución.

En el laboratorio de Serología la mayor parte de los residuos de riesgo generados o inherentes a su actividad son clasificados en el grupo III o residuos específicos que requieren de medidas especiales de prevención, recogida, transporte, almacenamiento y eliminación dentro y fuera del laboratorio.

4.3.-Programa de limpieza y desinfección

En general, en el área de Serología se deben cumplir las normas y el programa general de limpieza, mantenimiento y revisión de las instalaciones elaborado por laboratorio de Microbiología Clínica.

El procedimiento que contempla las normas de lavado y desinfección de locales, instalaciones y material de trabajo deben estar bien protocolizado y recogido en el "Manual de Seguridad."

En serología se deberían utilizar como desinfectantes, dependiendo de las características y composición del objeto o material a desinfectar:

- Hipoclorito sódico a una dilución de 50000 p.p.m. de cloro libre
- Detergente yodóforo a la dilución recomendada por el fabricante
- Etanol al 70%
- Detergentes desinfectantes tipo Virkon® (peróxido tamponado con surfactante).

5. – MANUALES DE PROCEDIMIENTOS

El Laboratorio de Serología deberá tener disponible y actualizado de forma permanente para todo el personal un Manual que recoja todas las instrucciones de trabajo o los procedimientos específicos y normalizados de trabajo (PNT) en relación con las pruebas serológicas que se realicen y los instrumentos que se utilizan con este fin. En el PNT de cada prueba serológica se debe establecer su procedimiento de control de Calidad y su procedimiento de Registros de Calidad, y su diseño vendrá guiado por las directrices generales del Sistema de Calidad del laboratorio de Microbiología Clínica. La elaboración de los PNTs es responsabilidad del facultativo del laboratorio de Serología, deben ser aprobados por el responsable de la Calidad y autorizados por el director o jefe del laboratorio de Microbiología Clínica, el cual, así mismo, refrendará cualquier revisión de los procedimientos, sus modificaciones o la inclusión de otros nuevos.

6. – CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN SEROLOGÍA EN LA FASE PREANALÍTICA

Aunque, las normas básicas para el control de Calidad en la fase preanalítica han sido comentadas con detalle en capítulo 01 de este documento, se deben establecer unas directrices generales que garanticen la Calidad durante la etapa preanalítica del diagnóstico serológico. Estas directrices deberían incluir o abordar los subapartados que se enumeran a continuación.

6.1.- Condiciones de las muestras clínicas para estudio serológico

Todos los aspectos que afectan a su obtención, transporte al laboratorio, almacenamiento o conservación y procesamiento inicial adecuados, relativos a las muestras de Serología, deben quedar reflejados en un "Manual de recogida, transporte y conservación de muestras", bien específico o dentro de un documento común de todo el laboratorio de Microbiología. En este manual se debe establecer de forma clara y precisa la forma de obtención de cada muestra clínica, con los medios y utensilios necesarios, la cantidad mínima necesaria para cada prueba o estudio serológico, así como las condiciones de conservación y transporte de las mismas, que dependen tanto de la propia muestra como de la determinación clínica solicitada.

6.2.- Condiciones de aceptación o rechazo de las muestras

El laboratorio de Microbiología debe determinar si la muestra recibida para estudio serológico cumple con los requisitos de Calidad para su análisis, de acuerdo con los criterios de Calidad establecidos por el propio laboratorio en el Manual de normas de recepción y aceptación de muestras. Estos criterios deben incluir, entre otros:

- o Correcta identificación de la muestra.
- o Cumplimentar todos los datos e información de la solicitud o petición.
- o Adecuación del tipo de muestra a la prueba diagnóstica solicitada.
- o Justificación diagnóstica.
- o Condiciones de conservación y transporte adecuados de la muestra.

Así mismo, el laboratorio de serología debería disponer de un registro de las solicitudes, además de un registro de incidencias de muestras.

6.3.- Preparación y conservación de las muestras

El tipo de muestra utilizada con mayor frecuencia en las pruebas para diagnóstico serológico es la sangre (suero, plasma, sangre total) y, en menor medida, otros fluidos biológicos, como líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, etc. Estas muestras deben, en ocasiones, ser sometidas a un procesamiento inicial o pretratamiento antes de su análisis, que debe quedar reflejado en el correspondiente Procedimiento Normalizado de Trabajo. Entre los tipos de técnicas de pretratamiento o preparación de las muestras en serología los más habituales son la centrifugación, las técnicas de concentración (filtración, ultracentrifugación), adsorción con extractos antigénicos específicos, inactivación por calor, etc.

Además, las muestras sometidas a ensayos serológicos se deberían conservar congeladas en alícuotas a una temperatura inferior a -20°C durante un periodo mínimo de 2 años.

6.4.- Conservación, almacenamiento e utilización de los reactivos

Aunque los aspectos más relevantes en éste punto están recogidos en el capítulo 02 del documento, en general, el laboratorio de Serología debe garantizar la Calidad de los reactivos utilizados en las pruebas de diagnóstico serológico. Para ello, deberá disponer de los siguientes documentos actualizados:

- Registro de reactivos, donde se especifiquen, al menos, la fecha de recepción, número de lote, condiciones físicas, fecha de caducidad y personal responsable de la aceptación y conservación.
- Documento técnico de utilización del reactivo, que debería incluir los siguientes datos:

- o Especificaciones del reactivo, que comprende la descripción del producto y sus componentes así como sus indicaciones (para que prueba serológica está indicado) y objetivo.
- o Controles que deben utilizarse, frecuencia de control y condiciones de aceptabilidad.
- o Método de lectura utilizado y descripción del tipo de lectura de los resultados.
- o Limitaciones del reactivo, de su uso o de sus resultados.
- o Condiciones de conservación.
- Control Registros de Calidad de los reactivos: Debido a que la mayoría de los reactivos usados en Serología son *kits* comerciales, se debe solicitar al fabricante que disponga de un Sistema de Calidad reconocido, el cual, debe facilitar al laboratorio los datos de control de Calidad y Validación de cada lote de reactivos. De esta forma el laboratorio solo debe verificar en la validación inicial del ensayo que el reactivo cumple con las especificaciones establecidas. En general, los controles de calidad de los reactivos y sistemas comerciales se deben basar en las recomendaciones del fabricante e incluyen sus propios controles y estándares o calibradores.

6.5.- Evaluación preanalítica de las pruebas diagnósticas

Las distintas pruebas usadas en diagnóstico serológico de las enfermedades infecciosas utilizan con frecuencia diferentes metodologías, técnicas de enzimoanálisis (EIA), inmunoblot, inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación etc, las cuales deben ser evaluadas y validadas para los distintos ensayos a los que se aplican, antes de su introducción en la práctica diagnóstica. La implantación de éstas metodologías se debe realizar siguiendo las recomendaciones de los organismos internacionales o nacionales que las han aprobado y garantizan su uso con fines diagnósticos.

En general, en la evaluación de una prueba o ensayo serológico se deben determinar los siguientes parámetros:

- Coeficiente de variación en pruebas con resultados cuantificables.
- Sensibilidad y Especificidad.
- Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.
- Precisión (reproducibilidad, repetitividad).
- Aplicabilidad y factibilidad: seguridad, coste, rapidez y destreza requerida.
- Limitaciones de la prueba.

Siempre que para una determinada prueba serológica exista otra de referencia, los parámetros anteriores deben ser analizados y comparados con respecto a ésta última. En el laboratorio de serología para la mayor parte de pruebas diagnósticas se utilizan sistemas o *kits* comerciales. La elección de un sistema comercial frente a otro debe hacerse en función de los resultados obtenidos en su evaluación comparativa con la utilización de paneles de sueros provenientes de un organismo internacional (OMS), siempre que sea posible, y las recomendaciones establecidas en la literatura. También deberán analizarse aspectos de aplicabilidad adaptados a las características particulares de cada laboratorio. Así mismo, el laboratorio de serología debe analizar de forma exhaustiva los datos generados en los programas de calidad interna y externa con dichos sistemas comerciales.

Los fabricantes de los sistemas comerciales deben facilitar al laboratorio los datos de evaluación validación de cada lote, así como garantizar la calidad del producto.

6.6.- Adecuación clínica de las pruebas diagnósticas: algoritmos diagnósticos y perfiles serológicos

El diagnóstico serológico de las enfermedades suele hacerse en la práctica clínica por el estudio de las muestras mediante la utilización de perfiles serológicos. La lógica de las agrupaciones de pruebas serológicas se basa en que, generalmente, el problema clínico requiere la investigación sindrómica de varios patógenos como posibles agentes etiológicos, responsables de la patología infecciosa del paciente. De éste modo, los diversos patógenos son analizados casi de forma simultánea en la muestra, y se obtiene así una mayor eficacia desde el punto de vista clínico.

El laboratorio de serología debería implantar la utilización de perfiles serológicos, tales como, perfil respiratorio, hepatitis virales, embarazo, infecciones congénitas, infecciones exantemáticas, agentes neurotrópicos etc. Es recomendable que estos perfiles contemplen niveles que se ejecutan según los resultados del nivel anterior, si bien, esta práctica puede introducir una complejidad organizativa que no siempre está al alcance de algunos laboratorios que no dispongan de un adecuado soporte tecnológico. Así mismo, cada laboratorio podrá utilizar aquellos perfiles serológicos que más demanda y rendimiento tengan en su área.

Con objeto de obviar al máximo la posibilidad de obtener resultados falsos positivos o negativos en las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico o cribado de la infección, con una importante repercusión en el paciente, por ejemplo, la infección por los virus de la inmunodeficiencia humana y de la hepatitis C, la sífilis, etc., el laboratorio de serología debe usar algoritmos, tanto diagnósticos como de confirmación, en el diagnóstico de una infección concreta. Estos algoritmos describen una serie finita de instrucciones o etapas en la aplicación de los ensayos serológicos con objeto de dar solución a un problema de diagnóstico específico.

6.7.- Control del Laboratorio de referencia

En la Cartera de Servicios del Laboratorio de Microbiología Clínica debe constar el o los laboratorios o centros de referencia, donde se envían las muestras clínicas para estudio de aquellas determinaciones serológicas no disponibles. En la selección del laboratorio de referencia se deben tener en cuenta los criterios señalados por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), como es, la existencia de un sistema de calidad del mismo, con programas de control de Calidad interno y externo de todos los procedimientos analíticos y con validación nacional o internacional. Además, el laboratorio de serología deberá cumplir con las condiciones de transporte y conservación de muestras establecidas su Manual de recogida, transporte y almacenamiento de muestras, descritas en el capítulo 01 del documento. Así mismo, debe disponer de un sistema de registro del envío de muestras al laboratorio de referencia.

7.- CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE SEROLOGÍA EN LA FASE ANALÍTICA

7.1.- Realización de los ensayos

Las pruebas serológicas están sometidas a una variabilidad que debe ser controlada tanto como sea posible. Una de las formas obvias de conseguirlo es realizarlas de una forma estandarizada. En este sentido, es obligada la redacción de Procedimientos (o Instrucciones) Normalizados de Trabajo, que son documentos que contemplan las instrucciones, técnicas y de otro tipo, que deben ser seguidas cada vez que se realiza dicho ensayo. El diseño de estos documentos debe seguir las especificaciones comunes que determine cada laboratorio, algunas de las cuales (Objetivo, Ámbito de aplicación, Responsabilidades, etc.) serán obligadas para todas las áreas de dicho laboratorio. Por lo que respecta a la instrucción técnica propiamente dicha, el documento deberá considerar estos apartados obligados:

- Condiciones de aceptación de la muestra: tipo o tipos de muestra sobre la que se aplica, conservación de ésta y, opcionalmente, procedimientos preanalíticos a los que hay que someterla.
- Normas de seguridad e higiene: si la técnica no tiene riesgos específicos, deberá remitirse a documentos generales de seguridad; si por el contrario, existen riesgos específicos, éstos deben constar explícitamente en el Procedimiento.
- Estándares y controles a incluir para la realización de los ensayos.
- Procedimiento técnico de realización del ensayo: debe ser lo suficientemente detallado para que pueda ser realizado por un operador con el mínimo de entrenamiento. Si el procedimiento operativo es muy largo y complejo, se debe considerar la posibilidad de dividirlo en documentos separados y secuenciales, de manera que se facilite su seguimiento por el operador. Esta

recomendación se aplica especialmente en aquellas técnicas en las que puedan identificarse fases secuenciales.

- Criterios de aceptación de los resultados del ensayo (validación técnica): deben especificarse claramente los valores esperables de todos los controles incluidos en el procedimiento; si se trata de valores cuantitativos, hay que delimitar el intervalo aceptable de éstos o de sus correspondientes medidas instrumentales.
- Expresión de los resultados: la forma en que un valor analítico se traslada al informe. Cuando sea pertinente, en este apartado debiera especificarse también aquellas condiciones de los valores analíticos que se asocian con nuevos ensayos o determinaciones analíticas. Ejemplo de esto último serían: a) repetición por el mismo método de determinaciones con valores cercanos a puntos de corte, b) generación de otras determinaciones analíticas (métodos) de confirmación, y c) generación de pruebas analíticas complementarias o subsidiarias del proceso clínico.

7.2.- Validación técnica

Por definición, todas las pruebas de diagnóstico serológico deben incluir controles cada vez que se realizan. El tipo y características de los controles a incluir dependerán de cada prueba, en función del número de muestras, tipo de técnica, periodicidad en que se lleva a cabo, etc. Todas las pruebas deben incluir, cada vez que se realicen, al menos un control positivo y otro negativo, de procedencia externa siempre que sea posible. Siempre que se posible también se recomienda introducir en los ensayos controles críticos (por ejemplo, controles positivos débiles, esto es, muestras con un débil contenido de anticuerpos).

En la práctica de los laboratorios de Serología es habitual el empleo de reactivos y sistemas de procedencia comercial que incluyen sus propios controles y estándares. En este caso, como norma general, todos los ensayos se llevarán a cabo con todos los controles y estándares especificados y suministrados por el fabricante, salvo que el laboratorio decida incluir los suyos propios. En este supuesto, es obligado que, previamente, el laboratorio lleve a cabo una validación de las nuevas condiciones de realización del ensayo.

Para que un ensayo sea válido, es obligado que se cumplan todas las especificaciones de validación técnica contempladas para cada técnica. Salvo casos excepcionales, si los valores obtenidos con los controles no se ajustan a lo previsto, los resultados de todas las muestras no son válidos y deben repetirse en ensayos posteriores. Más raramente puede aceptarse parcialmente los resultados correspondientes a determinadas muestras. En todo caso, los criterios de validación técnica, tanto total como parcial, deben aparecer claramente delimitados en el apartado correspondiente de cada Procedimiento Normalizado de Trabajo.

7.3.- Monitorización de los ensayos y control de lotes

La validación técnica no permite, por sí misma, la detección de los errores sistemáticos a que se ven sometidas las determinaciones analíticas serológicas, especialmente cuando se trata de pruebas cuantitativas. Por todo ello, los laboratorios deben introducir obligadamente un sistema de registro de la información más relevante de los ensayos, de manera que pueda ser utilizada con posterioridad mediante técnicas estadísticas. La información a registrar dependerá de cada técnica analítica serológica pero, con fines informativos, se debe considerar lo siguiente:

- Fecha de realización (hora) y operador u operador responsable.
- Lote(s) de reactivos, estándares y controles.
- Valores instrumentales obtenidos con estándares y controles.
- Valores de interpretación (valores de corte *cut-off*, etc.)

8.- CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE SEROLOGÍA EN LA FASE POSTANALÍTICA

8.1.- Diseño de los informes

Una vez concluida la validación técnica y clínica de los ensayos, el facultativo especialista en Microbiología debe aportar un informe correspondiente a los resultados obtenidos de las determinaciones serológicas realizadas en la muestra clínica a estudio. El laboratorio de serología deberá elaborar un procedimiento para la comunicación de los informes. En el Manual del usuario o en la Cartera de servicios debe estar recogido el tiempo de respuesta para las determinaciones de urgencia y de rutina.

En el informe debe constar la siguiente información:

- Nombre del laboratorio.
- Nombre y apellidos del paciente.
- Identificación codificada del paciente: números de historia clínica, Tarjeta Sanitaria, afiliación a la Seguridad Social, Documento Nacional de Identidad, etc.
- Unidad o centro solicitante.
- Nombre del facultativo solicitante
- Tipo de Muestra, fecha y hora de obtención.
- Descripción del ensayo, prueba o determinación:
 - o Perfil serológico en el que se adscribe el ensayo (ejemplo: hepatitis, respiratorio, etc.).
 - o Descripción concisa e informativa del tipo de prueba o ensayo y de anticuerpos o antígeno que determina (ejemplo: "Anticuerpos IgM anti-virus varicela-zoster", "Antígeno VHC", etc.).
 - o Método serológico utilizado (EIA, IFI, *Inmunoblot*, HA).
- Criterios de Interpretación de la prueba o ensayo y limitaciones del método.
- En la prueba cualitativa, se debe informar el resultado como positivo, negativo o indeterminado; si es cuantitativa se debe informar la unidad de medida y los valores de referencia, expresada en unidades internacionales/mL o en unidades arbitrarias/mL o en títulos (ejemplo: "Anticuerpos IgG anti-Rubeola/EIA/: 150 UI/mL")
- Debe contemplarse la posibilidad de incluir comentarios interpretativos, indicando la necesidad de nuevos estudios si procede. Estos comentarios podrán referirse a una determinación concreta, a agrupaciones de ellas o al conjunto de la solicitud analítica.
- Debe indicarse si se trata de un informe provisional o definitivo.
- La firma del facultativo especialista en Microbiología clínica que valida el informe
- Fecha de emisión del informe

El laboratorio de Serología debe garantizar la confidencialidad de los pacientes respecto a los resultados emitidos en cumplimiento de la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (1999). Los registros de los informes emitidos por el laboratorio deberían archivarlos durante un período mínimo de 2 años y un máximo aconsejado de 10 años. Por todo ello, el laboratorio de serología debería disponer de un procedimiento que asegure la confidencialidad de los resultados del paciente.

8.2.- Validación clínica y facultativa

La validación técnica no evita la aparición de resultados espurios o incongruentes con el proceso clínico del paciente de quien se ha obtenido la muestra. Para evitar estas situaciones negativas, el laboratorio debe introducir un sistema de validación facultativa en la fase postanalítica. En ella, una persona con entrenamiento y conocimientos suficientes (el facultativo responsable de esa área de laboratorio), debe decidir la aceptación o no de un determinado resultado analítico o de un conjunto de ellos. La forma de realizar la validación clínica-facultativa dependerá de cada técnica y de aspectos organizativos de cada laboratorio pero, en todo caso, es un elemento obligado dentro del sistema de Control de Calidad interno que debe quedar perfectamente especificada en los manuales organizativos propios.

9.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS DE CONTROL INTERNO PARA CONTROL DE TENDENCIAS

9.1.- Fundamentos y aplicación

Los métodos estadísticos persiguen detectar los errores sistemáticos propios de los ensayos serológicos, que pueden ser debidos a defectos instrumentales, de los reactivos o del operador. El control estadístico detecta tendencias en los valores instrumentales que cada ensayo asigna a un material de control que se introduce cada vez que se lleva a cabo éste, y decide, mediante reglas predefinidas si la dispersión de los valores instrumentales se explica por la variabilidad aleatoria que todo procedimiento de medida tiene o, por el contrario, si obedece a errores sistemáticos.

El control estadístico se aplica fundamentalmente a los métodos que cuantifican la presencia de anticuerpos en la muestra de forma continua. Para llevar a cabo el control estadístico se utilizan los valores instrumentales obtenidos con la muestra de control (por ejemplo, absorbancia), o la concentración de anticuerpos calculada según el procedimiento.

Los procedimientos analíticos serológicos siguen una distribución normal (Gauss), en la que el 68,3% de los valores están dentro de la media ± 1 SD (desviación estándar), el 95,5% dentro de la media ± 2 SD, y el 99,7% en el intervalo media ± 3 SD. Por lo tanto, si un valor queda fuera de este último intervalo, con gran probabilidad es inaceptable.

Para estudiar la dispersión, se parte de un valor objeto (*target value*) que, habitualmente, es la media de una serie de determinaciones realizadas en ensayos consecutivos de una misma muestra de control. Esta muestra puede ser de procedencia externa o del propio laboratorio. Algunos sistemas comerciales incluyen controles que pueden ser utilizados con este fin.

9.2.- Cuándo se deben aplicar métodos de control estadístico

Dado el gran espectro de determinaciones serológicas, está claro que no todas ellas son susceptibles de un análisis estadístico. Sin embargo, es igualmente obvio que el laboratorio debe introducir este tipo de análisis en el mayor número de las determinaciones que realiza. Se debe hacer en las siguientes circunstancias:

- Determinaciones muy habituales, que se realizan con una periodicidad mínima de dos veces a la semana.
- Determinaciones de gran significación clínica. En este momento, parece obligado:
 - Detección de anticuerpos anti-VIH.
 - Detección de anticuerpos anti-VHC.
 - Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).
 - Anticuerpos anti-HBs.
 - Anticuerpos IgM anti-*core* del virus de la hepatitis B (HBcAg, IgM).
 - Detección de anticuerpos específicos anti-*Treponema pallidum* por EIA.

9.3.- Cómo se lleva a cabo el control estadístico

El control estadístico de las pruebas cuantitativas se lleva a cabo en las siguientes etapas:

- **Cálculo del valor diana (*target value*):** a menos que se disponga de un patrón internacional de concentración valorada, el valor central es la media de los valores instrumentales (absorbancia, por ejemplo) o de la concentración de anticuerpos calculada por el procedimiento en 20 determinaciones sucesivas de la misma muestra de control.

- **Documentación de los resultados del control de calidad interno:** a partir de estas 20 determinaciones, se debe calcular la media y la desviación estándar de la serie. Una vez esto, aunque no es obligado, se puede hacer una representación gráfica en la que en el eje de ordenadas se indica el valor medio y los intervalos comprendidos entre la media $\pm 1SD$, $\pm 2SD$ y $\pm 3SD$. Estas representaciones son muy habituales y se conocen como gráficos de Shewhart o de Levey-Jennings.
- **Introducción de material de control interno:** un patrón internacional, un patrón suministrado por el sistema (*kit*) comercial, o una alícuota de una muestra procedente del propio laboratorio. Se recomienda introducir dos muestras de control interno si el número de determinaciones del ensayo es superior a 30. Los controles internos se analizan en idénticas condiciones que cualquier muestra.
- **Validación de cada ensayo y detección de errores sistemáticos:** mediante los procedimientos que se describen en los apartados siguientes.

9.4. Invalidación de un ensayo mediante las reglas de Westgard

Se deben anular los resultados de un determinado ensayo si el valor obtenido con la muestra de control interno:

- Está fuera del intervalo comprendido entre la media $\pm 3SD$.
- Todos los valores obtenidos con las 10 últimas determinaciones están situados bien por encima o bien por debajo de la media.
- Si se introducen dos muestras de control idénticas (lotes de más de 30 muestras), la diferencia entre ambas excede $4SD$.

9.5. Valores que obligan a la revisión

Se aplica lo siguiente:

- Cuando se obtiene un valor situado fuera del intervalo de la media $\pm 2SD$ (pero inferior a $\pm 3SD$). En este caso, no se anula el ensayo pero debe revisarse toda la validación técnica.
- Si se obtienen dos valores de este tipo en el mismo lado de la gráfica, probablemente existe un error sistemático: debe revisarse la calibración instrumental y el lote de reactivos en uso.
- Si se obtienen cuatro valores consecutivos comprendidos entre la media $\pm 1SD$ en el mismo lado de la gráfica, de nuevo estamos ante un error sistemático y hay que proceder como en el ejemplo anterior.
- Si se sospecha una tendencia no detectada por los métodos anteriores, se puede calcular el índice de la desviación estándar, según la fórmula:

$$\text{Índice SD} = m_s - m_a / SD_a$$

En donde:

m_s : media de los valores de los ensayos sospechosos.

m_a : media acumulada de los ensayos anteriores (mínimo 20).

SD_a : desviación estándar acumulada de los ensayos anteriores (mínimo 20).

Si el índice supera el valor 1 en valor absoluto, existe un error sistemático y hay que proceder de la misma manera que antes.

10.- CONTROL, VERIFICACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS INSTRUMENTOS Y EQUIPOS ESPECÍFICOS DE SEROLOGÍA

Deberá tenerse en cuenta todo lo especificado en el documento CCI-SEIMC-04 en cuanto a inventario, identificación y registro de los aparatos y equipos. Además, muchos de los instrumentos que se

utilizan en el laboratorio de Serología son comunes a otras áreas de Microbiología Clínica. Este apartado se refiere al instrumental de uso específico en Serología.

En términos generales, todos los equipos deberán ser verificados y sus especificaciones iniciales validadas de forma periódica y cada vez que se someten a una reparación que pueda tener incidencia sobre las medidas. De la misma forma, todos los instrumentos y equipos deben estar sometidos a un plan sistemático de mantenimiento, incluyendo la limpieza y desinfección. Todos estos aspectos deben estar consignados en los Procedimientos Instrumentales correspondientes y registrados de forma trazable.

10.1.- Pipetas automáticas

Las pipetas automáticas son instrumentos de utilización muy extensa en Serología, y su fiabilidad puede influenciar de forma manifiesta la calidad de los resultados. Su utilización y mantenimiento debe seguir pautas establecidas en Procedimientos Normalizados, y deben ser calibradas de forma periódica.

En cuanto al mantenimiento, incluye una limpieza y lubricación según las recomendaciones de cada fabricante y su periodicidad dependerá del uso al que se someta. En principio, deberá hacerse con carácter mínimo mensual, y siempre que se tenga evidencia de una aspiración accidental de muestra.

Por lo que se refiere a la calibración, hay que distinguir si se trata de pipetas de volumen fijo o variable. En este último supuesto, la calibración se hará sobre dos volúmenes: se recomienda que uno de ellos sea el mínimo, y el otro se seleccionará en función del uso (por ejemplo, un volumen cercano al que habitualmente se toma con esa pipeta). La periodicidad de la calibración, dependerá también del uso de la pipeta, siendo como mínimo semestral.

La calibración podrá hacerse por una empresa autorizada y certificada, pero también podrá ser realizada por el propio laboratorio. Se determinará la exactitud (error sistemático), la repetitividad (error aleatorio), y la estanqueidad. Los valores aceptados de exactitud y precisión se relacionan en la tabla siguiente, y dependen del volumen de trabajo:

Volumen fijo (µl)	% Exactitud media (Intervalo)	% CV
Entre 40 y 1000	98-102	2
20	96,5-103,5	3,5
10	95-105	5

Para determinar la exactitud se realizan diez pesadas de un volumen teórico de agua destilada, en una balanza de precisión con una sensibilidad de $1\pm 0,1$ mg, **convenientemente calibrada**. El volumen se calcula con la fórmula $V=P/d$, en donde d es la densidad a la temperatura del experimento (medida con termómetro de mercurio calibrado a su vez). La exactitud se define:

$$\% \text{ exactitud} = \text{volumen medio} / \text{volumen teórico} \times 100$$

La repetitividad (precisión) se calcula mediante el coeficiente de variación (CV), también a partir de los datos de pesada y posterior conversión a volumen real, según la fórmula:

$$\%CV = \delta_{n-1} (\text{volumen real}) / \text{volumen medio} \times 100$$

donde δ_{n-1} es la desviación estándar de las pesadas individuales.

Por último, la estanqueidad se comprueba cargando las pipetas con un volumen de líquido, manteniéndola en posición vertical durante 1 min y comprobando que no se hace visible una gota en la punta de la pipeta. Dada su simplicidad, se recomienda llevar a cabo este proceso con mayor frecuencia, ya que es una forma sencilla de detectar un funcionamiento incorrecto de las pipetas.

10.2.- Lectores de ELISA en microplaca

Se trata de aparatos de uso muy extendido en los laboratorios de Serología. Lo más habitual es que estos instrumentos formen parte de equipos más complejos, como los descritos en el apartado 10.4. Aquí se relacionan los aspectos de control interno instrumental que afectan a los aparatos individuales:

- Diariamente:
 - o Comprobación general de funcionamiento (lo suele hacer el propio sistema).
 - o Limpieza de las superficies externas con productos no agresivos, siempre siguiendo normas del fabricante.
 - o Desinfección con alcohol de 70% si se aprecian vertidos evidentes. Pueden utilizarse otros productos recomendados por el fabricante.
- Semanalmente:
 - o Desinfección sistemática con alcohol de 70% (o productos recomendados por el fabricante) de las zonas en contacto con las muestras.
- Trimestralmente:
 - o Limpieza de elementos internos.
 - o Lubricación de los elementos mecánicos.
- Anualmente, y cada vez que se produzca una avería significativa:
 - o Comprobación de la linealidad en el intervalo de absorbancia de 0 a 1,5, o en el que indiquen las especificaciones técnicas del aparato en cuestión. Puede llevarse a cabo con un cromóforo (12 concentraciones diferentes crecientes, 8 réplicas), a una longitud de onda fija, o mediante una placa de calibración con filtros de vidrio de absorbancia conocida. En ambos casos, el coeficiente de correlación r debe ser mayor de 0,98 para todo el intervalo de linealidad.
 - o Repetitividad. También se lleva a cabo con un cromóforo o con una placa de calibración, sobre tres ensayos independientes. Los límites tolerables para los valores máximos y mínimos son:
 - Media $\pm 0,5\%$, para el intervalo de absorbancias de 0-1,5.
 - Media $\pm 1,5\%$ para el intervalo de absorbancias de 1,5-2,5.
 - o Exactitud: no debe exceder del 1% sobre un ensayo de 20 réplicas.

10.3.- Lavadores de microplaca

Igual que antes, suelen formar parte de equipos más complejos, por lo que la comprobación de su funcionamiento se realizará dentro de un plan más general; por ejemplo, puede comprobarse mediante un análisis de tendencias, como se ha indicado en el apartado 9 de este documento. Los límites tolerables dependerán de la técnica analítica concreta para la que se utilicen. El plan de mantenimiento debe contemplar una limpieza externa diaria y una verificación de las especificaciones con carácter semestral.

10.4.- Sistemas robotizados y autoanalizadores

Se trata de instrumentos complejos cuyo control de calidad y mantenimiento precisos rebasan los límites de este documento. Además, por su propia naturaleza, existe una gran variabilidad entre los distintos sistemas disponibles comercialmente. Por lo general, todos ellos contemplan un plan de control y mantenimiento detallado, que debe constituir la base del plan específico diseñado por cada laboratorio, junto con algunas de las recomendaciones que se hacen a continuación. Dicho plan incluye algunas operaciones que lleva a cabo el personal del laboratorio y otras que dependen de personal especializado del Servicio Técnico del suministrador. Todas las operaciones de control y

mantenimiento deben quedar bien definidas en un Procedimiento Normalizado de Trabajo del aparato, en el que se contemplen:

- Tipo de operación.
- Periodicidad con que se debe llevar a cabo.
- Personal encargado de cada operación.
- Registros de Calidad aplicables.

Las operaciones que deberán llevarse a cabo incluyen:

- Diariamente
 - o Limpieza de las áreas externas, de la pantalla o visor y de las zonas de carga de muestras, con desinfección incluida si se observan vertidos manifiestos. Deben utilizarse productos no agresivos y seguir las recomendaciones del fabricante.
 - o Comprobación general del funcionamiento: habitualmente, este procedimiento lo realizan automáticamente los equipos (*auto-check*).
- Trimestralmente
 - o Limpieza de áreas internas (filtros, ventiladores, etc.).
 - o Lubricación general de los elementos mecánicos.
- Anualmente, y cada vez que haya una avería que les afecte:
 - o Verificación de todos los elementos relacionados con las medidas (sistemas de pipeteado y dispensación, temperatura de incubadores, lectores de absorbancia, luminiscencia, etc.). Para ello se utilizarán procedimientos similares a los descritos en el apartado 10.2. de este documento. Los aspectos a verificar serán
 - Linealidad.
 - Repetitividad.
 - Exactitud.

No obstante, dada la complejidad de estos instrumentos, es obligado realizar un control de tendencias para la detección de errores sistemáticos, tal como se ha descrito en el apartado anterior.

Respecto al mantenimiento preventivo sistemático, deberá ser el recomendado por el fabricante, con una periodicidad mínima semestral.

11.- REFERENCIAS

Anónimo. 12.7. Enzyme-linked immunosorbent assay plate reader. En: Isenberg HD (ed). Clinical microbiology procedures handbook. Washington: American Society for Microbiology Press, 1992; 2:12.7.1.-12.7.12.

Gray JJ. Internal quality control in serodiagnosis. En: Snell JJS (ed). Quality assurance. Principles and practice in the microbiology laboratory. Londres: Public Health Laboratory Service, 1999; pp 185-205.

Gutiérrez J, Fernández F, Soto MJ, Maroto MC. Control de calidad interno del inmunodiagnóstico microbiano para conseguir la calidad total. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19:488-494.

Howanitz PJ, Howanitz JH. Quality assurance. En: Rose N, Conway de Macario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds). Manual of clinical laboratory immunology (5ª ed). Washington: American Society for Microbiology Press, 1997; pp 1201-1212.

Loza Fernández de Bobadilla E, Alomar Cardell P, Bernal Zamora A, Harto Castaño A, Pérez Sáenz JL, Picazo de la Garza JJ, Sarazá Linares ML. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. En Picazo JJ (ed): Procedimientos en microbiología clínica, vol 10. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) 2000.

Westgard JO. Planning statistical quality control procedures. En: Rose N, Conway de Macario E, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds). Manual of clinical laboratory immunology (5ª ed). Washington: American Society for Microbiology Press, 1997; pp 1180-1200.

12.- RESUMEN DE NORMAS Y RECOMENDACIONES

12.1.- Normas y aspectos de cumplimiento obligado

a) Personal

- Técnicos con capacitación específica para realización de técnicas serológicas.
- Supervisión y responsabilidad final por parte de un especialista en Microbiología Clínica.

b) Condiciones ambientales

- Manual o procedimientos (instrucciones) de seguridad.
- Manual o procedimientos de gestión de residuos

c) Documentación

- Elaboración de documentación normalizada (manuales, procedimientos y registros).
- Gestión documental.

d) Fase preanalítica

- Manual o instrucciones de obtención, transporte y conservación de muestras.
- Manual o procedimientos de aceptación de muestras.
- Registros y documentación de los reactivos utilizados.
- Evaluación previa de la idoneidad técnica y clínica de las pruebas.
- Algoritmos diagnósticos y de confirmación en pruebas de alta repercusión clínica.
- Evaluación de la competencia de laboratorios de referencia para pruebas diferidas.

e) Fase analítica

- Elaboración de procedimientos (instrucciones técnicas) normalizados.
- Inclusión de controles positivo y negativo en todas las técnicas serológicas.
- Sistemática de validación técnica de los resultados analíticos.
- Forma definida de expresión de los resultados.
- Registro de datos para futuros análisis estadísticos (tendencias).

f) Fase postanalítica

- Formato definido y normalizado de los informes de resultados.
- Definición de tiempos de respuesta para las pruebas serológicas.
- Medidas activas de protección de la confidencialidad.
- Validación clínica y facultativa de los resultados.
- Archivo de los resultados analíticos durante un mínimo de 2 años.
- Introducción de métodos estadísticos para control de tendencias (errores sistemáticos) en pruebas de alta significación clínica o de elevada frecuencia de realización.

g) Control y mantenimiento instrumental

- Elaboración de procedimientos y registros instrumentales.
 - Verificación periódica de las especificaciones de instrumentos y equipos.
 - Elaboración de programas de mantenimiento preventivo
-

12.2.- Procesos y recomendables

a) Personal

- Programas y registros de formación continuada para todo el personal.
-

b) Fase preanalítica

- Registro de incidencias con las muestras.
 - Conservación de alícuotas durante un mínimo de dos años.
 - Elaboración de perfiles clínicos y algoritmos diagnósticos.
-

c) Fase analítica

- Inclusión de controles positivos con valores críticos en pruebas cuantitativas.
-

d) Fase postanalítica

- Informes de resultados con comentarios interpretativos de pruebas, agrupaciones o solicitudes diagnósticas.
 - Archivo de resultados durante 10 años.
-

CCI-SEIMC-11

RECOMENDACIONES PARA EL CONTROL DE LA CALIDAD INTERNO EN MICROBIOLOGIA MOLECULAR

María Luisa Mateos Lindemann¹ y Roberto Alonso Fernández²

¹ Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Ctra. Colmenar Km. 9.1. Madrid 28034
Teléfono: 91 336 87 87. Fax: 91336 88 09. Correo electrónico: mmateos.hrc@salud.madrid.org

² Servicio de Microbiología. Hospital Gregorio Marañón. Madrid. C/ Doctor Esquerdo, 46. Madrid
28007 Teléfono: 915868793. Correo electrónico: ralonso.hgugm@salud.madrid.org

Ampliado y revisado por: **Núria Margall**

Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. Avda. S.A.M. Claret 167.
08025 Barcelona. Correo electrónico: nmargall@hsp.santpau.es

El presente documento se distribuye como copia no controlada

Indice

	<u>Pags.</u>
Objeto	3
Alcance	3
Personal	3
Calidad en la fase pre-analítica	3
Calidad en la fase analítica	4
Diseño del laboratorio de Biología Molecular	4
Area de preparación de reactivos	5
Area de preparación de la muestra	5
Area de amplificación	5
Area de detección	5
Otros recursos para garantizar la calidad	6
Material	6
Hábitos de trabajo	6
Sistemas enzimáticos y químicos de control de contaminación	6
Verificación y calibración de equipos	7
Inclusión de controles	7
Controles negativos	7
Controles positivos	8
Controles internos	8
Calibradores de técnicas cuantitativas	8
Calidad en la fase post-analítica	9
Conclusiones	9
Tabla Resultado	10
Referencias	10

Objeto

En el Area de Microbiología Molecular se realizan las determinaciones diagnósticas basadas en sistemas moleculares, y especialmente aquellas en las que se detectan y cuantifican los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Debido al rápido desarrollo de estas técnicas en los últimos años, es imprescindible una estandarización de los métodos, equipo, espacio y organización del laboratorio de diagnóstico clínico. El objeto es establecer unas normas mínimas de calidad para garantizar la fiabilidad de las técnicas y sobre todo, la veracidad de los resultados.

Alcance

Las recomendaciones se aplicarán a las técnicas de Microbiología Molecular que se realicen en el Servicio de Microbiología para el diagnóstico y control de tratamiento de determinadas enfermedades infecciosas

Personal

El equipo de trabajo estará formado por los técnicos de laboratorio (o ATS) y facultativos responsables del Servicio de Microbiología.

Los técnicos de laboratorio se encargarán del registro de temperaturas de aparatos, la preparación de los puestos de trabajo, la recepción y comprobación de las muestras en el Area y su preparación para ser conservadas hasta su procesamiento, informarán al responsable del Area de cualquier problema, incidencia o dato de interés para el desarrollo de la actividad del Area, la limpieza y recogida de los puestos de trabajo al finalizar la jornada. Así mismo debe realizar las técnicas diagnósticas y el registro informático de las muestras recibidas y mantener las bases de datos en caso de que las hubiera.

El responsable del laboratorio debe tener una titulación superior (médico, farmacéutico, biólogo o químico) con formación en Microbiología y Biología Molecular. Su función consistirá en la supervisión de los procesos que se desarrollen en el Area de Microbiología Molecular, la programación del trabajo del laboratorio en función de la demanda, la interpretación de los resultados así como la emisión de informes y su validación, la realización de estadísticas de carga de trabajo y resultados así como su exposición en sesiones, la formación del personal del laboratorio en cualquier técnica nueva así como en las modificaciones de las técnicas existentes. Todo el equipo procurará mantener y mejorar la calidad de la actividad del laboratorio.

Las directrices generales del laboratorio serán decididas por el responsable del Area en colaboración con el Jefe de Servicio.

Todo el personal del laboratorio debe mantener un plan de formación continuada interno o externo activo que garantice la preparación requerida.

Calidad en la fase pre-analítica

La fase pre-analítica comprende la extracción de la muestra, la conservación y el transporte al laboratorio. La calidad de los resultados de las pruebas depende en gran parte de la calidad de la muestra, así como de un transporte y conservación adecuados. En esta fase es importante recordar dos aspectos: i) los ácidos nucleicos (especialmente el ARN) se degradan con mucha facilidad por nucleasas, ii) hay que evitar las contaminaciones cruzadas muestra/muestra y la contaminación de los reactivos.

Las técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedades infecciosas se pueden realizar a partir de cualquier tipo de muestra (sangre entera anticoagulada, sangre seca en papel de filtro, medula ósea, suero o plasma, células blancas, esputos, lavados broncoalveolares, LCR, orina, biopsias, etc.). Cada tipo de muestra necesitará un sistema de extracción adecuado. Algunas muestras complejas son más susceptibles de inhibir algunos sistemas de detección por lo que será necesario la inclusión de "sensores" de inhibición (controles internos). Idealmente, las muestras deben extraerse en un sistema cerrado (ej. la sangre en un envase tipo Vacutainer), aunque en ocasiones es difícil (ej. heces). Algunos anticoagulantes, como la heparina, son potentes inhibidores de las reacciones de PCR por lo que trataremos de evitarlos.

Es fundamental incidir en la rapidez del transporte de la muestra al laboratorio. Si esto no es posible (por ejemplo, traslado a laboratorios de referencia), será importante estudiar la conservación adecuada de la muestra. Las muestras, además, ya en el laboratorio de Microbiología, deberán ser conservadas adecuadamente hasta su procesamiento. Se pueden utilizar diversas sustancias caotrópicas para inactivar las actividades ADNasas y ARNasas presentes (como el isotiocianato de guanidina), aunque generalmente es suficiente con la congelación de la muestra. La temperatura óptima de congelación es -80°C aunque podría ser suficiente con -20°C si vamos a detectar moléculas de ADN. El nitrógeno líquido es un buen sistema de conservación en casos de largos periodos de tiempo entre la extracción y la determinación analítica.

Calidad en la fase analítica

La fase analítica comprende todas los procesos a los que es sometida una muestra desde su recepción al laboratorio hasta la emisión del resultado. Las técnicas moleculares cuentan con peculiaridades propias que condicionan gran cantidad de factores analíticos a su alrededor, desde el diseño del laboratorio y el material necesario para su realización (reactivos y equipos) hasta la forma de trabajar. Su gran sensibilidad hace a este tipo de técnicas especialmente susceptible a la contaminación y con ello al "falso positivo". Las técnicas enzimáticas, además, son muy sensibles a las posibles inhibiciones causadas por sustancias químicas contenidas en la muestra (ej. hemoglobina, EDTA) o incluidas durante los diferentes procesos en el laboratorio (ej. alcoholes, disolventes orgánicos). Es interesante disponer de listados actualizados acerca de los inhibidores de la PCR y de la concentración a la que inhiben la reacción. Las inhibiciones pueden ser origen de resultados "falsos negativos". El laboratorio de Microbiología Molecular utilizará una serie de recursos para evitar el "falso positivo" y el "falso negativo" o para detectarlos de forma eficiente en caso de producirse.

Diseño del laboratorio de Microbiología Molecular

Los laboratorios que realizan técnicas de amplificación de ácidos nucleicos deben contar con separación física de áreas de trabajo para minimizar la posibilidad de contaminación. El diseño ideal incluye cuatro áreas de trabajo: área de preparación de reactivos, área de preparación de la muestra (extracción de ácidos nucleicos), área de amplificación y área de detección de productos amplificados.

El flujo de trabajo debe ser unidireccional, desde el primer área a la última, evitando o limitando al máximo el retroceso. Es fundamental que cada área tenga su material exclusivo, incluyendo equipos, gradillas, pipetas y material fungible (puntas de pipeta, tubos de plástico etc.), y no se intercambie éste bajo ningún concepto. Cada área debe contar con lámparas ultravioletas conmutadas con la iluminación normal o temporizadas, para que durante la ausencia del personal (normalmente durante la noche) las moléculas de ácidos nucleicos presentes sean destruidas para

evitar contaminaciones posteriores. Al final de la jornada laboral, el material utilizado y las superficies de cada área deberán ser limpiadas con soluciones de hipoclorito sódico al 5% seguidas de etanol al 70%. En el caso de la limpieza de las superficies de las cabinas de trabajo se recomienda utilizar una solución al 10% de Instrunet (solución de glutaraldehído al 50%, glioxal al 40%, formol al 40% y cloruro de didecildimetilamonio) puesto que el hipoclorito de sodio oxida las superficies metálicas y causa daños irreparables en las de metacrilato). La ventilación de cada área debe ser independiente. En los laboratorios de grandes instituciones de referencia, cada área contará con una doble puerta con presión positiva las tres primeras áreas y negativa la última por ser ésta la más peligrosa como fuente potencial de contaminaciones (rica en productos amplificados).

A continuación se da una breve descripción de cada una de las áreas de trabajo:

Area de preparación de reactivos

En este espacio se almacenan, se preparan y se hacen alícuotas de los reactivos. Es el área de preparación de las mezclas de reacción o "master mix". Los reactivos utilizados deben tener grado "Biología Molecular" y deben ser libres de nucleasas. Los fabricantes deben proporcionar certificados de análisis y grado de pureza. Es necesario alícuotar los reactivos proporcionados en grandes volúmenes para evitar contaminaciones y ciclos de congelación/descongelación. Las alícuotas deben ser suficientemente pequeñas para evitar reusarlas, se identificarán convenientemente y se conservados a -20°C o a -80°C , indicando la fecha de caducidad.

El área debe contar con material general exclusivo, una nevera con congelador y opcionalmente una cabina de flujo laminar de protección de la muestra.

La reconstitución de sondas liofilizadas se efectuará siempre con agua destilada estéril, libre de nucleasas.

Si se utilizan sondas marcadas con fluoróforos se debe tener cuidado especial en su manejo por ser fotosensibles y por ello, siempre se protegerán de la luz.

Area de preparación de la muestra

En este área se realiza el procesamiento del material biológico y la extracción de los ácidos nucleicos. Las muestras deben ser manipuladas en cabinas de seguridad biológica.

El área contará con material general exclusivo y una cabina de flujo laminar de Clase II que garantice la seguridad del técnico y la protección de la muestra.

Antes de su utilización se deberá decontaminar el aire de la misma poniendo luz ultravioleta durante 30 min. como mínimo.

Area de amplificación

En ella se añaden los ácidos nucleicos extraídos a las "master mix" y se efectúa el proceso de amplificación.

Debe contar con material general exclusivo, una cabina de flujo laminar de protección de la muestra y equipos para la amplificación (ej. termocicladores).

Area de detección

Es conveniente que esta área se halle lo más alejada posible de las áreas de preparación de reactivos y de preparación de la muestra.

En ella se produce el análisis de los productos finales y se generan los resultados. Esta área es especialmente peligrosa como fuente de contaminaciones potenciales dado que se generan gran cantidad de moléculas "copia" o amplicones y estas abundan en el ambiente, en el material del área y en todas sus superficies. Por ello deben extremarse las precauciones enunciadas con anterioridad: no intercambiar material, que no exista flujo inverso de trabajo, irradiación ultravioleta y limpieza exhaustiva de material y superficies.

El área debe contar con una nevera con congelador para conservar los productos de las reacciones, y en ella suelen estar los equipos automáticos de análisis.

En algunos laboratorios el área de preparación y de amplificación constituye un área única. En otros, la adición a las "master mix" del ADN o ARN extraído, se realiza en el área de preparación y la amplificación se efectúa en el área de detección.

Otros recursos para garantizar la calidad

Material

La mayoría de los sistemas comerciales incluyen todo el material necesario para realizar la determinación. Algunos, sin embargo, solo cubren ciertas etapas del proceso. En otras ocasiones se opta por poner a punto una técnica en el laboratorio ("in house") prescindiendo de sistemas comerciales, o porque éstos no existen en forma comercializada para ciertos marcadores. En ambos casos es fundamental utilizar reactivos de alto grado de pureza y con ausencia certificada de nucleasas. Antes de utilizar esta técnica para el diagnóstico de rutina, se debe efectuar una puesta a punto de la misma, con controles previamente validados, tanto externos como internos. Ello nos proporcionará la sensibilidad y especificidad experimental de la prueba. También se debe realizar una valoración de la misma con muestras retrospectivas y con la mayor información clínica disponible (revisión de historias clínicas) con el fin de analizar la sensibilidad y especificidad clínicas que la puedan validar como método diagnóstico de rutina.

El material de plástico deberá ser de alta calidad y certificado libre de nucleasas. Se recomienda usar tubos con tapón de rosca y juntas estancas de goma para evitar contaminaciones.

Las puntas de pipeta necesitan mención especial. Se trata, probablemente, del material de mayor consumo en el laboratorio de Biología Molecular. Su calidad es fundamental. Es importante la certificación "libre de nucleasas" y la utilización de filtros de barrera. La calidad del filtro puede ponerse de manifiesto al pipetear una solución ligeramente coloreada a través del filtro. Una punta de buena calidad no permitirá que el colorante atraviese el filtro. En caso contrario, la barrera de la punta no garantizaría su integridad a la hora de evitar contaminaciones cruzadas.

Otro sistema a utilizar es el de pipetas de desplazamiento positivo, que evitan que los aerosoles que se puedan crear al pipetear bruscamente una muestra lleguen a la parte inferior de la pipeta y puedan contaminar una nueva muestra.

Hábitos de trabajo

El trabajo en el laboratorio de Microbiología Molecular debe ser especialmente riguroso y metódico. Los volúmenes de trabajo son pequeños, el control de tiempos de incubación muy estricto y las técnicas complejas.

Es muy importante la utilización permanente de guantes desechables para protección de las muestras de nucleasas. Los guantes deberán cambiarse con frecuencia. Debe llevarse bata de laboratorio que idealmente debería ser exclusiva de cada área. Una buena opción es la utilización de batas desechables en cada una de las áreas.

Debe evitarse la producción de aerosoles durante los procedimientos de pipeteo y apertura y cierre de tubos. Una buena práctica consiste en someter a los tubos a una breve centrifugación antes de ser abiertos para evitar que los tapones contengan gotas de condensación o salpicaduras producidas por agitaciones en vórtex.

Las cabinas deben contar con lámparas ultravioletas para su descontaminación y deben encenderse 30 minutos antes de su utilización para la estabilización del flujo laminar.

Los procedimientos de limpieza y descontaminación deben ser especialmente rigurosos.

Sistemas enzimáticos y químicos de control de contaminación

Se han desarrollado métodos enzimáticos y químicos para controlar la contaminación por amplicones en técnicas de PCR. El método enzimático se basa en la actividad uracil N-glicosilasa (UNG) y en su capacidad de romper las moléculas de ADN que contienen uracilo. La "master mix" debe contener dUTP en lugar de dTTP, de forma que las moléculas amplificadas contienen uracilos. La UNG en medios con pH alto y elevadas temperaturas, corta el ADN por sus residuos de uracilo inactivándolo como molde para amplificaciones sucesivas. El pre-tratamiento de las mezclas de reacción con UNG, elimina la posible presencia de moléculas contaminantes sin afectar al ADN molde nativo (por contener timinas). La UNG no es activa durante la reacción de amplificación por lo que las moléculas de nueva síntesis no se ven afectadas.

El método químico, menos utilizado, supone la amplificación del ADN en presencia de un reactivo, los isopsoalenos. La posterior irradiación con ultravioletas de la reacción amplificada, supone una modificación química de las pirimidinas que imposibilita la re-amplificación del ADN.

Verificación y calibración de equipos

La comprobación del correcto funcionamiento de los diferentes instrumentos utilizados en el laboratorio es una práctica esencial para garantizar la calidad de los resultados emitidos.

Las pipetas deben ser periódicamente comprobadas y calibradas. El método más sencillo consiste en la pesada de volúmenes de agua destilada. La media de varias pesadas debe estar comprendida dentro del intervalo especificado por el fabricante. Todas las pipetas se suministran con una herramienta destinada a realizar ajustes en el volumen ejecutado. Existen laboratorios que ofrecen programas de mantenimiento de pipetas (verificación y calibración).

Los termocicladores suelen contar con sistemas de auto-chequeo para su mantenimiento. Es conveniente, además, comprobar la reproducibilidad y exactitud de su funcionamiento con una sonda externa de temperaturas. Las sondas son proporcionadas por los principales fabricantes de termocicladores. La verificación debe realizarse al menos en 12 pocillos de cada bloque de 96. No deberían detectarse variaciones mayores a $\nabla 1^{\circ}\text{C}$ entre la temperatura seleccionada y la real.

Las cabinas de flujo deben verificarse periódicamente para asegurar la protección de la muestra y/o del usuario.

Las neveras, congeladores e incubadores den ser termometrados diariamente, reflejando el registro de las temperaturas, y los baños y termobloques antes de cada uso.

Para los equipos automáticos, debe seguirse el plan de verificación, calibración y mantenimiento indicado por el fabricante.

Inclusión de controles

Todos los procesos analíticos deben tener un número suficiente de controles. La utilización de controles adecuados es especialmente importante en las técnicas moleculares, pues gracias a ellos podemos detectar la presencia de contaminaciones e inhibiciones (falso positivo y falso negativo). En técnicas cuantitativas nos permiten, además, detectar desviaciones en la cuantificación.

A) Controles negativos

Se trata de muestras previamente caracterizadas como negativas, mezclas de reacción sin muestra o simplemente agua estéril para PCR, libre de nucleasas. Deben ser capaces de detectar la presencia de contaminaciones (falsos positivos)

Los controles negativos deben estar presentes en número suficiente (una recomendación general es que un 5% de las muestras correspondan a controles negativos), homogéneamente distribuidos a lo largo de las muestras procesadas o preferentemente hacia las posiciones finales de modo que detecten contaminaciones de "arrastre" en caso de estar presentes.

Una técnica con controles negativos contaminados invalida el ensayo y hace necesario repetir el procesamiento de las muestras incluidas.

B) Controles positivos

Un control positivo es una muestra previamente caracterizada que ofrece una reacción positiva en una técnica determinada. Este control debe ser capaz de detectar la presencia de falsos negativos en la reacción. Un buen control positivo debe contener un número bajo de copias de molécula diana, próximo a la sensibilidad analítica del ensayo, para detectar cualquier defecto de eficiencia de los sistemas diagnósticos.

Los controles positivos deben estar presentes en número suficiente, homogéneamente distribuidos a lo largo de las muestras procesadas o preferentemente hacia las posiciones iniciales de modo que produzcan contaminaciones de "arrastre" en caso de estar presentes.

Una técnica con controles positivos inhibidos invalida el ensayo y hace necesario repetir el procesamiento de las muestras incluidas.

Las técnicas cuantitativas deben contar, al menos, con dos controles positivos, uno de baja carga y otro de alta carga. Existirá un rango de tolerancia para cada uno de ellos y si no se cumple se invalidará el ensayo y será necesario repetir el procesamiento de las muestras incluidas.

Los geles de electroforesis utilizados para detectar productos deben incluir marcadores de peso molecular para dimensionar las bandas observadas en las muestras problema.

C) Controles internos

Se trata de un control positivo que va incluido dentro del tubo de reacción de cada muestra a analizar. El control interno debe ser capaz de monitorizar todo el proceso analítico de una muestra.

Un buen ejemplo lo constituye el control interno incluido en la PCR cualitativa de VHC suministrada por uno de los principales proveedores de sistemas de PCR. El control interno es una molécula de ácido nucleico que se añade al tampón de lisis utilizado para la extracción del ARN viral. El control mencionado monitoriza el proceso de extracción, la purificación por precipitación con alcoholes, la actividad retrotranscriptasa y ADN polimerasa de la enzima y el proceso de detección por hibridación en fase líquida.

En caso de querer poner a punto una técnica *in house*, un control interno muy eficaz es el gen constitutivo de la célula eucariota, β -globina, que permite monitorizar todos los procesos que sigue una muestra hasta su amplificación y detección. Si la amplificación de una secuencia de este gen es negativa, significa o bien que la muestra no disponía de células, con lo cual no era adecuada para la PCR, que la extracción del ácido nucleico no ha sido adecuada o que no se han eliminado los inhibidores de la PCR.

Un buen control debe ser parecido en cuanto a secuencia y longitud a la molécula diana, debe utilizar los mismos oligonucleótidos para su amplificación y su concentración debe ser próxima al límite de detección de la técnica. El control interno sólo debe diferir de la molécula diana en alguna característica que le permita ser detectado de manera diferencial, una zona de secuencia distinta para su captura con una sonda específica o una longitud ligeramente diferente para su detección en electroforesis.

Todas las muestras deben ser capaces de ofrecer una señal positiva de control interno, incluso las muestras negativas. Una muestra negativa con control interno negativo debe ser considerada inhibitoria y debería ser repetida.

Si la muestra contiene inhibidores debería mostrar un control interno positivo tras ser diluida.

D) Calibradores de técnicas cuantitativas

Las determinaciones cuantitativas suelen incluir una serie de calibradores (estándares) que constituyen en general otro control de calidad del ensayo. Los calibradores deben distribuirse según una curva de regresión en caso de un ensayo aceptable. En algunos casos alguno de los calibradores va duplicado, lo que nos permite comprobar la reproducibilidad del ensayo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) dispone de estándares para VHC, VIH, VHB y Parvovirus B19 calibrados en Unidades Internacionales/mL.

Calidad en la fase post-analítica

La fase post-analítica comprende la interpretación de los resultados, su registro y la emisión de informes.

La naturaleza de la técnica incide en el grado de dificultad de interpretación de los resultados. La interpretación más sencilla correspondería a las técnicas comerciales cualitativas. En este caso, la positividad consiste en la superación de un valor, el "cut-off", especificado por el fabricante. En algunos casos existe una zona de incertidumbre denominada zona gris, en la que se

aconsejaría repetir la determinación o emitir un resultado dudoso. El otro extremo en la escala de dificultad de interpretación puede venir representada por técnicas de genotipado por secuenciación de ácidos nucleicos, recientemente introducidas en Microbiología, en las que existen multitud de algoritmos de interpretación publicados, que se actualizan continuamente.

Situaciones intermedias podrían ser las técnicas cuantitativas o las técnicas "domésticas" en las que se carece de la estandarización y del soporte técnico de empresas de reconocido prestigio.

El informe de resultados es una de las principales vías de comunicación entre el microbiólogo y el clínico y debe ser, por lo tanto, claro y conciso. El informe debe indicar el tipo de muestra analizado, el nombre del paciente, su procedencia y la fecha de extracción; la técnica empleada, el resultado, indicando unidades si es necesario y su interpretación; la fecha de emisión y la firma del facultativo responsable del área que ha validado el ensayo. El responsable del laboratorio debe estar dispuesto a ampliar la información o aclarar cualquier aspecto al médico que lo solicite.

También se pueden establecer redes de información entre el laboratorio y los distintos servicios clínicos, con el fin de que una vez creado y validado el informe para un paciente, éste pueda ser visualizado por el médico del paciente.

El registro de resultados permite el análisis global y la estimación de tendencias. La conservación de registros de resultados (informes de equipos automáticos, registros informáticos o registros gráficos de geles de electroforesis) puede ser de utilidad legal en determinadas situaciones. El análisis de las bases de datos de resultados nos aporta información sobre variaciones estacionales o geográficas. Nos permite además comprobar evoluciones de pacientes o respuestas terapéuticas.

Conclusiones

El área de Microbiología Molecular garantiza la calidad de su actividad asistencial con un diseño adecuado del laboratorio (separación de áreas y flujo de trabajo) que minimiza la probabilidad de contaminaciones, la inclusión frecuente de controles y unos hábitos de trabajo específicos. El control, verificación y calibración del material utilizado y la suscripción a programas de control de calidad externos, así como la adecuada formación del equipo es, además, fundamental para el correcto funcionamiento del laboratorio.

Tabla Resumen

	OBLIGADO	ACONSEJABLE
Responsable del Area, titulado superior con experiencia en Microbiología y Biología Molecular.	X	
Separación física de áreas de trabajo (al menos 3: preparación de la muestra, amplificación y detección).	X	
Laboratorios independientes para cada área de trabajo		X
Material exclusivo de cada área y no intercambiable	X	
Utilización de cabinas de flujo laminar de seguridad clase II con iluminación ultravioleta.	X	
Iluminación ultravioleta en los laboratorios.		X
Limpieza de superficies al final de la jornada laboral (se recomienda hipoclorito sódico al 5% seguido de etanol al 70%).	X	
Utilización de "kits" diagnósticos de reconocido prestigio y reactivos de calidad (grado "Biología Molecular") para técnicas "in house"	X	
Utilización de material de plástico garantizado "libre de nucleasas". Puntas con filtro.	X	
Utilización permanente de guantes y bata de laboratorio.	X	
Utilización de sistemas enzimáticos o químicos de control de la contaminación.		X
Inclusión frecuente de controles de reacción (positivos, negativos, internos y calibradores)	X	
Verificación y calibración frecuente de equipos	X	
Mantenimiento de un registro físico o informático de resultados.	X	

Referencias

- Madej R. Using Standards and Controls in Molecular Assays for Infectious Diseases. *Molecular Diagnosis* 2001;5:4,335-345
- Casisi Raggi C, Pinzani P, Paradiso A, Pazzagli M, Orlando C. ExteARNI Quality Assurance Program for PCR Amplification of Genomic DNA: An Italian Experience. *Clinical Chemistry* 2003;49:5, 782-791
- Valentin-Thon E. Quality control in nucleic acid testing-where do we stand? *JouARNI of Clinical Virology* 2002;25:S13-S21
- Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry* 1998;44:1, 12-26
- Richards C, Grody W. AlteARNtive Approaches to Proficiency Testing in Molecular Genetics. *Clinical Chemistry* 2002;49:717-718
- Cole, E.C. General Recommendations for Quality Assurance Programs for Laboratory Molecular Genetic Tests. Contract #200-98-0011. Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Practice Program Office. Division of Laboratory Systems. 1999. Atlanta, Georgia

- National Comitee for Clinical Laboratory Standards. Global Consensus Standarization for Health Technologies. (<http://www.nccls.org>)
- McGovern M.M., Benach M.O., Wallenstein S., Desnich R.J., Keenslyside, R. Quality Assurance in Molecular Genetic Testing Laboratories. JAMA, 1999. 281, 9.
- Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. eds. In PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications Academic Press, Inc. London. U.K.
- Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J., eds. In Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and Aplications. Mayo Fundations. 1993. Rochester MN, USA.

AUTORES

Fernando Alcaide Fernández de Vega

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Bellvitge. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias. Universidad de Barcelona. c/ Feixa Llarga s/n. 08907-L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona. Teléfono: 93 2607930. Fax: 93 2607547. Correo electrónico: falcaide@csub.scs.es

María Jesús Alcaraz Soriano

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia. Teléfono: 96.3987515
mjalcaraz@hotmail.com

Roberto Alonso Fernández

Servicio de Microbiología. Hospital Gregorio Marañón. Madrid. C/ Doctor Esquerdo, 46. Madrid 28007 Teléfono: 915868793. Correo electrónico: ralonso.hgugm@salud.madrid.org

Javier Aznar Martín

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla. Apdo 914. 41080 Sevilla. Correo electrónico: javier.aznar.sspa@juntadeandalucia.es

Rafael Borrás Salvador

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Hospital Clínico Universitario de Valencia, Universidad de Valencia. Avenida Blasco Ibáñez, 17. 46010-Valencia. Correo electrónico: Rafael.Borras@uv.es.

Rafael Cantón

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Carretera de Colmenar, km 9. 28034 Madrid. Correo electrónico: rcanton.hrc@salud.madrid.org

Emilia Cercenado Mansilla

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid. C/ Doctor Esquerdo, 46. Madrid 28007 Teléfono: 915868793. Fax: 91-504-4906 Correo electrónico: ecercenado@teleline.es

Isabel de Fuentes Corripio

Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km 2. 28220-Majadahonda (Madrid). Correo electrónico: ifuentes@isciii.es

Amparo Farga Martí

Unidad de Microbiología. Hospital Arnau de Vilanova. Valencia. Teléfono 96 3868504. Correo electrónico: afarga@gva.es

Concepción Gimeno Cardona

Servicio de Microbiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia y Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. Avda Blasco Ibáñez, 17. 46010-Valencia. Teléfono: 96 3987823. Fax: 96 3987836. Correo electrónico: concepcion.gimeno@uv.es

Julián González Martín

Servicio de Microbiología. Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias. Universidad de Barcelona. c/ Villarroel, 170. 08036-Barcelona. Teléfono: 93 2275522. Fax: 93 2279372. Correo electrónico: gonzalez@clinic.ub.es

Ana Lloret Caballería

Unidad de Microbiología. Hospital Arnau de Vilanova. Valencia. Teléfono 96 3868504. Correo electrónico: lloret_ana@gva.es

Lorena López Cerezo

Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena. Avd Dr. Fedriani s/n. Sevilla. 41009. Teléfono 955 008138. Correo electrónico: lorenalc@terra.es

Elena Loza Fernández de Bobadilla

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Carretera de Colmenar, km 9. 28034 Madrid. Correo electrónico: eloza.hrc@salud.madrid.org

Lurdes Matas i Andreu

Profesor Asociado Universidad Autónoma de Barcelona. Servicio de Microbiología. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Carretera del Canyet s/n. Badalona. Barcelona. 08916. Teléfono 934 978 894 Fax: 934 978 895. Correo electrónico: lmatas@ns.hugtip.scs.es

María Luisa Mateos Lindemann

Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Ctra. Colmenar Km. 9.1. Madrid 28034. Teléfono: 91 336 87 87. Fax: 91336 88 09. Correo electrónico: mmateos.hrc@salud.madrid.org

Núria Margall

Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. Avda. S.A.M. Claret 167. 08025 Barcelona. Correo electrónico: nmargall@hsp.santpau.es

Luis Martínez Martínez

Servicio de Microbiología de Hospital Marqués de Valdecilla. Santander. Correo electrónico: lmartinez@humv.es

Consuelo Miranda

S. Microbiología. H. Virgen de las Nieves. Granada
Tlf. 95-8020119. Correo electrónico: consuelo.miranda.sspa@juntadeandalucia.es

Álvaro Pascual

Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina de Sevilla. Hospital Universitario Virgen Macarena. Avd Dr. Fedriani s/n. Sevilla. 41009. Teléfono 955 008138. Correo electrónico: apascual@us.es

Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica

ANEXO AUTORES

Realizado: Grupo colaborador GEGMIC

Fecha: 16-05-04

Versión: 1

Pág. 3/3

José Luis Pérez Saénz

Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca.

Teléfono: 971.175185

jlperez@hsd.es

Núria Rabella

Servicio de Microbiología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. Avda. S.A.M. Claret

167. 08025 Barcelona. Correo electrónico: nrabella@hsp.santpau.es

Juan Luis Rodríguez Tudela

Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Ctra.

Majadahonda-Pozuelo km. 2. 28220 Majadahonda. Teléfono: 91 822 3635. Fax: 91 509 79 66.

Correo electrónico: juanl.rodriiguez-tudela@isciii.es