

**FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGIA**

**Control de la calidad de los medios de cultivos en microbiología sanitaria
Quality control of the culture media in sanitary microbiology**

Ivett Soto Lazarte (1); Mariano Cobo Hernández (2); Odalis Perdigón Ruíz (3); Dania Reyes Álvarez (4); María C. Hunt Trujillo(5).

RESUMEN

En el desarrollo de programas de aseguramiento de la calidad en los laboratorios de Microbiología Sanitaria uno de los elementos esenciales es el control de la calidad de los medios de cultivos, teniendo en cuenta que éstos constituyen la base de todos los procesos que se acometen en estas instituciones. Por esta razón se hace un análisis del trabajo desarrollado por el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de Ciego de Avila desde el mes de octubre de 1998 a mayo del 2000 en la instrumentación de un programa de control de la calidad de los medios de cultivos. Este programa sin antecedentes en nuestra provincia, abarcó las siguientes etapas: adquisición de personal técnico, adiestramiento en las técnicas de control biológico de los medios de cultivos, organización del trabajo técnico del área de medios de cultivo, organización del área de esterilización, habilitación de un área para el control biológico de los medios de cultivos, confección de Procedimientos Normalizados de Operación y desarrollo del trabajo de control. Hasta mayo del 2000 se han controlado 14 medios de aislamiento (6 líquidos y 8 medios sólidos) y 10 medios diferenciales procedentes de Empresas Comerciales (OXOID y BIOCEN fundamentalmente), así como medios de cultivos producidos en el propio Laboratorio. Los resultados del análisis reflejan la contribución a elevar la calidad del trabajo del Laboratorio de Microbiología Sanitaria y por lo tanto la necesidad de su introducción en otros laboratorios de Microbiología de la provincia y el país.

Palabras claves: MEDIOS DE CULTIVO, CONTROL DE LA CALIDAD.

1. Ingeniera Química. Responsable del área de Control de la Calidad. Laboratorio de Microbiología Sanitaria.
2. Licenciado en Microbiología. Jefe del Laboratorio de Microbiología Sanitaria.
3. Técnico de Microbiología. Responsable del área de Microbiología de Alimentos. Laboratorio de Microbiología Sanitaria.
4. Licenciada en Química. Responsable del área de Medios de Cultivo. Laboratorio de Microbiología Sanitaria.
5. Técnico de Microbiología. Área de Medios de Cultivos. Laboratorio de Microbiología Sanitaria.

INTRODUCCIÓN

Algunos autores han considerado en sus experiencias personales al establecer programas de calidad en laboratorios de microbiología Sanitaria, tres grupos de errores más significativos: desviaciones en las temperatura de incubación, errores de escritura al plasmar los datos de las lecturas en los registros del laboratorio y problemas con la calidad en la elaboración de los medios cultivos.(1)

En muchos laboratorios dedicados al control microbiológico no siempre se presta la debida atención al óptimo funcionamiento de los medios de cultivos y como consecuencia de ello, muchas veces se emiten resultados que no son confiables. En algunos laboratorio se controla cualitativamente la productividad pero raramente se evalúa la selectividad como un elemento indispensable que casi siempre es la causa de que muchos analistas tengan dificultades en el aislamiento de algunos microorganismos, sobre todo los de requerimientos nutricionales más estrictos.(2)

Además, hay que tener en cuenta que al contrario de lo que sucede en los aislamientos de microorganismos patógenos en muestras clínicas, en los aislamientos de alimentos y aguas influyen significativamente los ingredientes constituyentes de la muestra, la flora de microorganismos acompañantes y las condiciones estresantes del medio que muchas veces dañan fisiológicamente al microorganismo y hacen más necesario el uso de medios de cultivos con rendimientos óptimos.(3,4) Los medios de cultivos son productos compuestos por nutrientes, factores de crecimiento, inhibidores, indicadores, etc., necesarios para el desarrollo de los microorganismos, y son muy susceptibles a cambios y deterioro en sus características y propiedades físicas, químicas y biológicas por la acción de la luz, el aire, el calor, la humedad y los cambios de pH. Debido a esto ha surgido la necesidad de considerar dentro de la validación de las técnicas microbiológicas el control biológico de los medios de cultivos utilizados en dichos laboratorios.(5)

La calidad de un medio de cultivo preparado no depende exclusivamente de la garantía que representa la marca o el fabricante del medio deshidratado o del proveedor de los ingredientes del mismo, sino de igual forma, o quizás en mayor grado de su correcta preparación. (5)

Estos conocimientos y la necesidad de instrumentar un sistema de gestión de la calidad en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria de Ciego de Avila, determinaron la decisión de elaborar un programa para el control de la calidad de los medios de cultivos, cuya instrumentación y resultados se exponen a continuación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Al enfrentarse la necesidad del control de la calidad de los medios de cultivos en el Laboratorio de Microbiología Sanitaria y no tener antecedentes de este tipo de trabajo en la provincia, se elaboró un programa para la instrumentación de éste control, a cumplir entre los meses de julio y octubre de 1998, desarrollándose posteriormente el trabajo de control de los medios de cultivos, como tal, a partir del mes de octubre de 1998 y hasta mayo del 2000. Este programa llevó al cumplimiento de las siguientes tareas:

Se ubicó a una Ingeniera Química como responsable de la actividad y se dispuso de un local de laboratorio para el desarrollo del trabajo.

Se adquirieron las cepas de microorganismos necesarias:

Escherichiacoli, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *V. cholerae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Citrobacter freundii*.

Se adiestró a la Ingeniera en toda la actividad del Laboratorio de Microbiología Sanitaria y en la actividad de Control de la Calidad de los medios de cultivos, así como en técnicas de calidad para la acreditación de laboratorios (esto último mediante un curso de postgrado en el INHA, Ciudad de la Habana).

Se confeccionaron los siguientes Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) siguiendo el formato recomendado en la Norma Cubana ISO/IEC FDIS 17025 de 1999 (6) que orienta los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de calibración y ensayo, con el objetivo de organizar todo el trabajo de las áreas de Elaboración de Medios de Cultivos, Esterilización y Control de la Calidad: PNO Uso, control y conservación de productos químicos, reactivos y medios de cultivos, PNO Proceso de esterilización, PNO Control y Limpieza de la cristalería, PNO Preparación, distribución y almacenamiento de medios de cultivos, PNO Uso, control y conservación de agua para análisis y PNO Control de la calidad de los medios de cultivos.

El PNO Control de la Calidad de los medios de Cultivos, que rige todo el proceso técnico para el control de la calidad biológica de los medios de cultivo, se elaboró teniendo como base el Anteproyecto de Norma Cubana de 1990: Control de la Calidad de los Medios de Cultivos utilizados en el diagnóstico bacteriológico y otras recomendaciones más recientes.(7,8)

Este procedimiento establece la determinación de la productividad y de la selectividad de los medios de cultivos mediante el uso de cepas controles. Además, define todos los elementos a tener en cuenta en el trabajo de control de los medios de cultivos, incluyendo la periodicidad del mismo.

Se confeccionaron los siguientes Registros de datos:

Control de la conductividad del agua, Control del Flujo Laminar de Medios de Cultivos, Proceso de esterilización, Control de equipos y medios de medición, Elaboración de medios de cultivo y Control de la calidad de los medios de cultivos.

Se comenzó el trabajo de Control de los medios de Cultivos en octubre de 1998 mediante tres tipos de controles diferentes: control de la calidad biológica, control de esterilidad y control del pH final.

Además, todos los medios de cultivos elaborados, previo a su uso en las áreas de diagnóstico del Laboratorio, se examinaron por Control de la Calidad y se liberaron sólo después del examen de sus características físicas (color, consistencia, distribución), esterilidad y pH final, así como el control biológico según el plan elaborado al efecto.

De octubre de 1998 a mayo del 2000, se controló la calidad biológica de 8 medios de aislamiento sólidos, 6 medios de aislamiento líquidos y 10 medios diferenciales, procedentes de empresas comerciales (OXOID, BIOCEN, FLUKA y una Empresa mexicana), así como de producción en el propio laboratorio a partir de ingredientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se procesaron para el control de la calidad biológica (productividad y selectividad) un total de 8 medios de cultivos sólidos (Tabla No. 1), distribuidos en placas de cultivos destinados todos al aislamiento de microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos y el agua, entre ellos Salmonella, Shigella, Vibrio cholerae, bacterias coliformes, Escherichiacoli y S. aureus.

Todos eran medios deshidratados comerciales, procesándose un total 20 lotes, de ellos 10 producidos por BIOCEN y 10 de la marca comercial inglesa OXOID. Se realizaron un total de 30 controles biológicos a estos medios resultando 28 controles satisfactorios y dos controles parcialmente satisfactorios. Este fue el caso del Agar SS de la marca comercial OXOID que presentó problemas con la selectividad al permitir el crecimiento de la E. coli sin inhibición. No obstante, no se rechazó el uso del medio teniendo en cuenta su buena productividad para la Salmonella y no disponer en esos momentos de un medio sustituto. Además, se tuvo en cuenta que, en el ensayo para el aislamiento de Salmonella de alimentos, el paso fundamental es el medio de enriquecimiento y se disponía de un buen medio líquido de éste tipo, garantizándose de esta forma mantener el diagnóstico. (9)

En la Tabla No. 2 aparece reflejado el control biológico de los medios de aislamiento líquidos. Se procesaron un total de 6 de estos medios distribuidos en tubos de cultivos y destinados al aislamiento de bacterias coliformes, Salmonella y Pseudomonaaeruginosa de muestras de alimentos y aguas. De estos 6 medios de cultivos se procesaron 19 lotes 14 se reconstituyeron a partir de formulaciones deshidratadas de las Marcas comerciales OXOID (6 lotes), BIOCEN (6 lotes), FLUKA (1 lote), México (1 lote) y 5 lotes se controlaron a partir de formulaciones realizadas en el propio Laboratorio a partir de ingredientes. En total se realizaron 27 controles, resultado 23 satisfactorios y 4 insatisfactorios.

De los controles insatisfactorios 3 controles resultaron del Caldo RV, medio deshidratado de la OXOID, lote 202372 que presentó serias dificultades con la productividad en la recuperación de Salmonella. Estos resultados condicionaron la realización de un estudio comparativo de este lote de la OXOID con un lote producido en el Laboratorio a partir de ingredientes, demostrándose las limitaciones de la formulación de OXOID con baja productividad para la recuperación de Salmonella thiphimurium como cepa control; mientras que el Lote producido en el Laboratorio a partir de ingredientes presentó buena productividad y selectividad. Se realizó una revisión de la literatura y se encontraron reportes de otros autores que señalan concentraciones de cloruro de magnesio hexahidratado, un constituyente inhibidor del medio, por encima del nivel óptimo (para la recuperación de Salmonella) en formulaciones comerciales (incluida OXOID) de este medio de cultivo y que limitaban la productividad del mismo. (10) Estos resultados llevaron a descartar el uso de este medio de la marca comercial OXOID (Caldo RV Código CM 669) y utilizar el medio confeccionado a partir de ingredientes. Posteriormente se comenzó a utilizar Caldo RV OXOID reformulado como Caldo Soya Peptona Rappaport-Vassiliadis (o Caldo RVS, Código CM 866), resultando los dos controles realizados a éste último medio de cultivo satisfactorios.

(5)

El otro control insatisfactorio fue del Caldo Acetamida, medio utilizado en la prueba confirmativa en el ensayo para la determinación del NMP de Pseudomonaaeruginosa en aguas. Este medio resultó totalmente improductivo para la recuperación de este microorganismo y se descartó su uso.

Los medios de cultivos diferenciales son un elemento importante en el diagnóstico microbiológico, porque permiten identificar características fisiológicas de los microorganismos que nos interesa diagnosticar.

En la Tabla No. 3 aparece reflejado el control de la calidad biológica realizado a estos medios. Se procesaron un total 10 medios diferenciales, controlándose un total de 32 lotes. A estos 32 lotes se les realizaron 36 controles con 35 controles satisfactorios y uno insatisfactorio. Este fue el caso del Medio MIU, medio multipropósito para la determinación de la producción de indol, hidrólisis de la urea y la motilidad. Al hacerse el análisis de este lote con control insatisfactorio se pudo comprobar que por un error del personal técnico del área de elaboración de Medios de Cultivos no se le había añadido la urea, que constituye uno de los ingredientes del medio y por lo tanto en el control no se pudo apreciar la hidrólisis de esta por la cepa Klebsiellapneumoniae, aspecto este totalmente imputable al trabajo del área de elaboración de Medios de Cultivos.

Otro elemento importante del control de calidad de los medios de cultivos lo constituye la evaluación de sus características finales previo a su uso. En este caso se evaluaron su esterilidad y el pH final.

(Tabla No. 4).

Se realizaron en el periodo un total de 596 controles de esterilidad, resultando insatisfactorios 8 controles. Las causas de éstos controles insatisfactorios analizadas en el momento en que se tuvieron los resultados del control, fueron 7 de ellos por mal funcionamiento de la autoclave y uno por error en la manipulación del equipo.

Por otra parte, se realizaron 432 controles del pH final de los medios de cultivos elaborados, resultando 11 de esos controles insatisfactorios. De esos 11 controles, 5 resultaron con desviaciones no tolerables para el uso del medio y se descartaron, mientras que en 6 controles se determinó el uso de éstos medios teniendo en cuenta que las desviaciones del pH del medio de cultivo en cuestión. estaban dentro del rango de pH óptimo del microorganismo objeto de estudio. En todos los casos en que se detectó desviaciones del pH final se realizaron los análisis correspondientes con los técnicos del área de Elaboración de Medios de Cultivos.

En la Tabla No. 5 se resumen todos los controles realizados en el periodo de estudio. Puede observarse que el porcentaje de controles insatisfactorio es de solamente 2,14. No tenemos elementos comparativos, pero consideramos que es bajo teniendo en cuenta las condiciones difíciles desde el punto de vista económica que atraviesa el país y que no permite contar con fuentes de suministro estables, no obstante ser la marca comercial OXOID de reconocida calidad internacional y BIOCEN, un productor nacional con sistema de calidad instaurados por las normas ISO 9000. Por otra parte, sólo el 0,62 % de los controles dieron resultados insatisfactorios imputables al trabajo del Laboratorio de Microbiología Sanitaria y específicamente a las áreas de Esterilización y Producción de Medios de Cultivos, lo cual avala la calidad de su trabajo.

Además, el área de Control de la Calidad de los Medios de Cultivos, antes de liberar a éstos para su uso, evalúa sus características físicas como son el color, la consistencia y la distribución adecuada.

En este caso, en dos controles se descartó el uso del Caldo Bilis

Verde Brillante por coloración no característica debido a excesivo calentamiento del mismo.

CONCLUSIONES

Por primera vez en la provincia Ciego de Avila se desarrolla y reporta un programa de control de la calidad de los medios en cultivo en laboratorios de Microbiología, lo que indudablemente permite la extensión de esta actividad a otros laboratorios teniendo en cuenta esta experiencia.

El resultado de los controles refleja un trabajo de calidad en las áreas de Elaboración de Medios de Cultivos y de Esterilización del Laboratorio de Microbiología Sanitaria, al ser bajo el porcentaje de controles insatisfactorios imputables a éstas áreas.

El desarrollo del programa de control de los medios de cultivos ha permitido elevar la calidad, y dentro de ello la confiabilidad del trabajo del Laboratorio de Microbiología Sanitaria en sentido general. La instauración y consolidación de un programa de control de la calidad de los medios de cultivos constituye un paso de avance hacia la consecución del objetivo fundamental del trabajo del Laboratorio de Microbiología Sanitaria de Ciego de Avila, que es lograr la acreditación de su trabajo técnico por el cumplimiento de las Norma ISO/IEC FDIS 17025 de 1999.

SUMMARY

Within the implementation of quality insurance plans at the Sanitary Microbiology laboratories one of the primary elements is the quality control of the culture media, taking into account that they constitute the basis of all the processes carried out at these institutions. That's why, an analysis is made of the work done at the Ciego de Avila Sanitary Microbiology Laboratory from the month of October 1998 to May of the year 2000; with the implementation of the aforementioned quality control plan of the culture media. Such program has no predecessor in our province comprising the following phases: acquisition of technical staff, training in the culture media biological control techniques, organization of the technical work of the culture media area, organization of the sterilizer area, remodeling of a room for the culture media biological control, the making of the Operation Standardized Procedures and the Promotion of the control work.

Until May, 2000, as many as 14 isolation media (6 liquid and 8 solid) have been controlled and 10 differential media from the Commercial Companies: (OXOID and BIOCEN) as well as the media cultured at the very laboratory.

The contribution to increase the work quality at the Sanitary Microbiology Laboratory and for the reasons expressed they should be put into practice at other Microbiology laboratories on the province and throughout the country.

Key Words: CULTURE MEDIA, QUALITY CONTROL

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peterz M. Quality assurance and quality control in Food Microbiology Laboratories. Swedish University of Agricultural Sciences. SLU Info/Repro: Uppsala, Sweden 1992.
2. Michanie SC, Rodríguez AC, Lara E, Brizzio A. Comparación de 3 métodos empleados para el control de calidad de medios de cultivos sólidos utilizados en Microbiología de Alimentos. Rev Cubana Aliment Nutr 1992;6(2):79-86.
3. Curtis GD, Beuchat LR. Quality control of culture media--perspectives and problems. Int J FoodMicrobiol 1998 Nov 24;45(1):3-6
4. Bolton FJ. Quality assurance in food microbiology a novel approach. Int J FoodMicrobiol. 1998 Nov 24;45(1):7-11.
5. Oxoid. Manual Oxoid. Unipath España S.A. 1995.
6. ISO/IEC FDIS 17025. Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Calibración y Ensayo. 1999.
7. MINSAP. Control de la Calidad de los Medios de Cultivos Utilizados en el Diagnóstico Bacteriológico. Ciudad de la Habana. 1990.
8. Weissfeld AS, Bartlett RC. Quality Management. En: Howard BJ, Keisser JF, Smith TF, Weissfeld AS, Tilton RC Editors. Clinical and Pathogenic Microbiology. St Louis: Mosby-Year Book, Inc., 1995:47-81.
9. Andrews WH, June GA, Sherrod PS, Hammack TS, Amaguana RM. Chapter 5. Salmonella. En: Bacteriological Analytical Manual. 8th. Edition. FDA. Estados Unidos. 1995:5.01-5.20.
10. Peterz M, Wiberg C, Norberg P. The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth of salmonella in home-made and commercially available dehydrated Rappaport-Vassiliadis broths. J Appl Bacteriol 1989; 66:523-528.

ANEXOS

Tabla No. 1 Resultados del Control de Calidad Biológico de Medios de Aislamiento Sólidos. Laboratorio de Microbiología Sanitaria. C. de Avila. Octubre 1998 a Mayo 2000.

Medio de Cultivo	Marcas	Lotes	Controles	Satisf.	Insatisf
Agar SS	OXOID	1	2	(2)*	?
	BIOCEN	4	6	6	0
Agar TCBS	OXOID	2	3	3	0
Agar Verde Brillante (M)	OXOID	3	5	5	0
Agar Mac Conkey	OXOID	1	2	2	0
	BIOCEN	1	1	1	0
Agar Violeta Rojo Bilis	OXOID	1	2	2	0
	BIOCEN	3	3	3	0
Agar Manitol Salado	BOCEN	2	2	2	0
Agar XLD	OXOID	1	1	1	0
Medio Baird-Parker	OXOID	1	3	3	0
Totales		20	30	30	0

* Parcialmente satisfactorio

Tabla No. 2 Resultados del Control de Calidad Biológico de Medios de Aislamiento Líquidos. Laboratorio de Microbiología Sanitaria. C. de Avila. Octubre 1998 a Mayo 2000.

Medio de Cultivo	Marcas	Lotes	Controles	Satisf.	Insatisf
Caldo Lactosado	OXOID	2	2	2	0
	BIOCEN	2	2	2	0
Caldo Bilis V. Brillante	BIOCEN	4	7	7	0
Caldo Tetrionato	OXOID	1	2	2	0
Caldo Selenito-Cistina	OXOID	1	2	2	0
Caldo RV	OXOID	1	3	0	3
	OXOID (R)	1	2	2	0
	Laboratorio	5	5	5	0
Caldo Acetamida	FLUKA	1	1	1	0
	MEXICO	1	1	0	1
Totales		19	27	23	4

Tabla No. 3 Resultados del Control de la Calidad Biológica de los Medios Diferenciales. Laboratorio de Microbiología Sanitaria. C. de Avila. Octubre 1998 a Mayo 2000.

Medio de Cultivo	Marcas	Lotes	Controles	Satisf.	Insatisf.
Agar Hierro Kligler	BIOCEN	2	3	3	0
Agar Hierro Lisina	BIOCEN	1	2	2	0
Agar Citrato Simm.	BIOCEN	2	4	4	0
Medio Manitol	Laboratorio	3	3	3	0
Medio Inositol	Laboratorio	3	3	3	0
Medio Sorbitol	Laboratorio	2	2	2	0
Caldo Arginina	Laboratorio	5	5	5	0
Caldo Ornitina	Laboratorio	5	5	5	0
Caldo Lisina	Laboratorio	5	5	5	0
Medio MIU	Laboratorio	4	4	3	1
Totales		32	36	35	1

Tabla No. 4 Controles de Esterilidad y pH final de los Medios de Cultivos. Laboratorio de Microbiología Sanitaria. C. de Avila. Octubre 1998 a Mayo 2000.

Controles	Cantidad	Satisf.	%	Insatisf.	%
Esterilidad	596	588	98,66	8*	1,34
pH final	432	421	97,45	11**	2,55

* Implicó el descarte de los medios de cultivos.

**De los 11 controles 5 fueron con desviaciones no tolerable y se descartaron los medios.

Tabla No. 5 Resumen del Resultado de los Controles de Calidad. Laboratorio de Microbiología Sanitaria. Ciego de Avila. Octubre 1998 a Mayo 2000.

Tipo de Control	Total	Insatisf.	%	Imputable	%
Control Biológico	93	5	5,37	1	1,08
Control de Esterilidad	596	8	1,34	1	0,17
Control de pH final	432	11	2,25	5	1,16
Totales	1 121	24	2,14	7	0,62