

CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUIA DE LABORATORIO

MICROBIOLOGIA CLINICA

V SEMESTRE

Alba Leonor Nájera de Herazo

Bacterióloga especialista en Microbiología Clínica

Facultad de Ciencia De La Salud

Programa de Bacteriología



© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector
Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General
Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica
Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero
Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad
Rosario López Guerrero

Directora de Investigación
Judith Herrera Hernández

Directora programa de Bacteriología
Rosana de la Torre Barboza

**Director de Biblioteca Miguel Henríquez
Castañeda-Cartagena**
Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar
Elayne Flórez Julio
Eliana Buelvas Pereira

Revisión y corrección de estilo
Zarina Durango Herazo

Autor
Alba Leonor Nájera de Herazo



TABLA DE CONTENIDO

Presentación	4
Normas generales de bioseguridad	5
Plan de trabajo	7
Materiales para todas las clases	8
Práctica 1 Toma y transporte de muestras	9
Práctica 2 Método para la elaboración de antibiogramas	31
Práctica 3 Piel y sus anexos	38
Practica 4 Enfermedades del tracto respiratorio	41
Practica 5 Infecciones de ojos oídos región mastoidea	45
Practica 6 y 7 Infecciones del tracto genital	49
Practica 8 Infecciones del Tracto Urinario	57
Práctica 9 y 10 Infecciones Gastrointestinales	61
Práctica 11 Abscesos y mordeduras inf de anaerobios	67
Practicas 12 y 13 Líquidos Corporales	72
Práctica 14 Hemocultivos y Mielocultivos	80
Práctica 15 Control de calidad en el laboratorio	83
Bibliografía	



PRESENTACIÓN

La guía de laboratorio de Microbiología clínica está destinada para ser empleada como instrumento de consulta para los estudiantes que se inician en el área diagnóstica específica.

Es importante que el estudiante aprenda, que la mayoría de los gérmenes patógenos se pueden cultivar en medios artificiales (fuera de su hábitat natural), teniendo en cuenta la preparación y selección adecuada de los medios de cultivos utilizados para el aislamiento de los microorganismos.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

Utilice siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas y gafas etc. Nunca circular con ropa de calle y/o se cambiarse de ropa dentro del Laboratorio.

- Siempre respete las señalizaciones de Bioseguridad.
- Reporte siempre a su docente los accidentes ocurridos en el Laboratorio.
- Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
- Los elementos corto punzantes como agujas, lancetas y otros, deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el guardián).
- Si padece lesiones exudativas o dermatitis debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
- Utilice, siempre, dispositivos de pipeteo mecánico en el manejo de líquidos y reactivos, nunca bucal.
- Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
- Es responsabilidad de usted como estudiante, el manejo del reactivo al que tenga acceso, conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
- Nunca debe esterilizar material limpio con contaminado.
- Nunca debe utilizar reactivos y/o sustancias químicas vencidas
- Utilice adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente, si un equipo se contamina con una muestra biológica, deberá se descontaminado con hipoclorito de sodio al 7% y luego limpiarlo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.



- En caso de rompimiento de un tubo o derrame en la centrifuga, apáguela inmediatamente y, espere treinta minutos antes de abrirla para evitar la formación de aerosoles.
- Descontamine las superficies de las mesas, al inicio y al final de una práctica de laboratorio o después de salpicaduras con sangre u otros líquidos corporales.
- La descontaminación debe hacerse con una solución de hipoclorito
- Toda Muestra biológica diferente a orina debe ser descontaminada con peróxido de hidrógeno al 30% para luego ser eliminada, en bolsas rojas.
- Todo material contaminado debe ser eliminado, en bolsa roja.
- Si usted derrama material contaminado en la mesa o el piso, cubra con hipoclorito de sodio al 2% el área contaminada, coloque papel absorbente por un tiempo mínimo de 15 minutos.
- Trabaje lo más cerca posible del mechero, flamee la boca de los frascos y tubos antes y después de tomar o sembrar las muestras.
- No caliente las pipetas en el mechero.
- Esterilicé antes y después de su uso el asa, y enfríe al aire por 10 – 15 segundos para no crear aerosoles microbianos al introducirlas caliente en los cultivos.
- No deje destapados los recipientes que contengan material microbiológico; el viento puede diseminarlos en el ambiente.
- Nunca deje un mechero encendido.



PLAN DE TRABAJO

1. Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se va a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, y los materiales y/o muestras necesarias para la ejecución de la misma.
2. Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica, no solo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente sino también de sus propias observaciones, investigación y deducciones
3. Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar
4. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
5. Asegúrese de marcar adecuadamente las láminas, tubos, cajas de y/o cultivos.
6. Tome todas las precauciones necesarias (evite contacto con ojos, boca y el resto del cuerpo) al momento de trabajar con microorganismos. Recuerde que los microorganismos con los que va a trabajar son patógenos.
7. Practique varias veces el procedimiento y en caso de dudas preguntar a su docente.
8. Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para una mejor realización del informe de laboratorio.
9. Al terminar limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los medios usados en los sitios destinados para esto. No deje material contaminado en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.
10. Limpie el microscopio antes y al final de la práctica. Recuerde que este equipo es fundamental para su trabajo. **¡Cúidelo!**
11. Siempre tenga en cuenta las normas de bioseguridad

Nota: Los portafolios de laboratorio pueden ser solicitados por su docente en cualquier momento por tanto debe mantenerlos actualizados.



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

1. Láminas (portaobjetos).
2. Láminillas (cubreobjetos).
3. Lápiz de Cera o marcador cristalográfico.
4. Cinta de enmascarar.
5. Guantes desechables.
6. Mascarilla o tapabocas.
7. Gafas de protección.
11. Toalla pequeña.
12. Papel de arroz.
13. Asa bacteriológica.
14. Muestra solicitada.
15. Guías de laboratorio previamente estudiadas.

INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS



PRÁCTICA N° 1 TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS CLÍNICAS.

I. INTRODUCCIÓN

El propósito del laboratorio de Microbiología clínica es el aislamiento e identificación de microorganismos implicados en un proceso infeccioso, para ello se debe establecer un protocolo correcto que permita, obtener y transportar muestras clínicas lo que se hace indispensable para lograr este propósito. Por esto es importante asegurar la calidad en la obtención de la muestra y la información que debe acompañarla durante el proceso que comienza en la fase previa al análisis, que incluye la preparación, la obtención y el transporte, lo cual concluye en el análisis de la muestra. Las fallas en cualquiera de los procedimientos llevan a pérdida en la calidad y confiabilidad de los resultados, lo más grave, a errores diagnósticos que terminan afectando la seguridad en la atención de los pacientes.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Familiarizar al estudiante con el manejo y transporte de las muestras clínicas para investigaciones microbiológicas.

Objetivos específicos:

- Identificar los medios adecuados que se utilizaran en cada caso.
- Tomar las muestras para cultivo y frotis para coloraciones.
- Diferenciar los procedimientos según el tipo de muestra.
- Conocer los métodos de asepsia para en cada tipo de muestra.
- Determinar los factores que influyen en el aislamiento de un agente etiológico



III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En términos de la efectividad del laboratorio de microbiología, nada es más importante que la apropiada selección, colección y transporte de las muestras clínicas.

Todo el personal que tiene que ver con la responsabilidad de toma de muestras, debe comprender lo determinante que es el mantenimiento de la calidad de la muestra, en la evaluación e informe de un espécimen clínico. Es responsabilidad del laboratorio proveer ésta información en forma clara y que sea fácilmente incorporada en la metodología de trabajo de todas las salas de atención y hospitalización, el cual debe estar siempre accesible al personal de enfermería y médicos como una referencia.

Independientemente del hecho de que algunos tipos de muestras requieren metodologías de colección muy especiales, podemos enumerar algunos aspectos generales que deben ser tenidos en cuenta al coleccionar las muestras clínicas:

- La muestra debe ser representativa del proceso infeccioso.
- Cuando se va a proceder a tomar un espécimen clínico, es importante evitar la contaminación con microorganismos saprofitos del área. Esta flora normal puede interferir con la interpretación del cultivo y enmascarar la presencia del verdadero agente etiológico de la enfermedad.
- Seleccione el tipo anatómico correcto donde se obtendrá el espécimen, y utilice la técnica apropiada y los instrumentos o elementos adecuados para su obtención.
- En el caso de investigar microorganismos anaeróbicos, la biopsia y el aspirado con aguja, son las muestras de elección. Los hisopos y sistemas tipo Culturette son los menos deseables para este fin.
- Nunca refrigere una muestra por anaerobios.



- Coleccione un apropiado volumen de muestra insuficiente material puede ser causa de resultados falso-negativos.
- Identifique cada muestra con el nombre del paciente, número de identificación personal (Número de seguro social o Cédula de identidad personal), procedencia, tipo de muestra, fecha de colección e iniciales del funcionario que tomó la muestra.
- Coloque la muestra en un receptáculo adecuado para su transporte con el fin de asegurar la sobrevivencia del posible agente infeccioso, evitar derrame del espécimen y mantener las medidas de bioseguridad apropiadas.
- Realice siempre un frotis por Gram para los especímenes que proceden de cavidades asépticas, y anote su interés en determinado microorganismo.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Medios de transporte Stuart o Cary Blair., baja lenguas, escobillones estériles, Gasas estériles, jabón líquido, Mecheros, tubos estériles, jeringas desechables, solución salina estéril.

Nota: Algunos tipos de escobillones utilizados en la toma de muestra, pueden contener sustancias inhibitorias para ciertos microorganismos patógenos y se hace necesario, utilizar tipos especiales de estos, si se quiere recuperar el agente infeccioso. Por ejemplos para investigar Neisserias patógenas se deben utilizar escobillones impregnados de Alginato de calcio para asegurar su recuperación.

V. MUESTRAS

Boca, faríngea, piel, sangre, líquido pleural, quemaduras, ocular, orina, genitales, muestras quirúrgicas, Líquido peritoneal, líquido ascítico, bilis, líquido articular, genitales, nasal, ódio, nasofaríngeo, rectal, úlceras, vesículas, huesos, catéter, líquido seminal.

VI. PROCEDIMIENTO

- Al tomar muestras de secreciones a diferentes partes del cuerpo para investigar



infección se debe:

- Hacer una asepsia preliminar con jabón quirúrgico y solución salina estéril antes de la toma.
- Tomar la muestra directamente del sitio afectado y se coloca en un medio de transporte que mantenga la viabilidad del agente patógeno.

GUÍA PARA LA COLECCIÓN DE ESPECÍMENES CLÍNICOS ABSCESOS, FÍSTULAS y HERIDAS:

- Limpie la superficie del absceso o herida con solución salina estéril o alcohol etílico al 70%.
- Si el absceso es cerrado, preferiblemente aspire con aguja la muestra de la base o de la pared de la lesión. También cultive por anaerobios.
- En caso de absceso abierto, fístula o herida, introduzca un hisopo profundamente dentro de la lesión, sin tocar el área superficial ya que puede introducir en la muestra bacterias que están colonizando la superficie y, no están envueltas en el proceso infeccioso.
- No cultive lesiones secas, a menos que esté presente el exudado.
- No envíe solo pus, ya que ésta no es representativa de la lesión. La base y bordes activos de la lesión son más apropiados.

HEMOCULTIVOS:

- Desinfecte el tapón de caucho del frasco de hemocultivos con alcohol etílico al 70%. No utilice solución de yodo para limpiar el caucho.
- Asépticamente desinfecte el sitio de la venopunción con alcohol etílico al 70% y luego con una preparación de yodo en círculos concéntricos hacia fuera del sitio elegido. Espere que el yodo seque y realice la punción sin palpar de nuevo.



- Coleccione la muestra de sangre a razón de 0.5 – 2 ml para niños y 5-10 ml para adultos en cada frasco. El volumen de sangre a cultivar es el factor más importante en la recuperación del microorganismo.
- Cada frasco debe ser servido con una punción diferente en diferentes tiempos, a menos que utilice a la vez frascos para organismos aeróbicos y anaeróbicos. Nunca llenar todos los frascos con sangre provenientes de una sola punción.
- No tomar sangre del catéter, a menos que se esté realizando un estudio epidemiológico.

QUEMADURAS:

- Limpiar y desbridar la superficie de la quemadura antes de proceder a coleccionar la muestra.
- Una pequeña cantidad de tejido puede ser apropiada para el cultivo.
- Realice cultivo aerobio solamente.

CÁTETER:

Limpiar la piel alrededor del catéter con alcohol etílico al 70%.

Asépticamente remueva el catéter y corte 5 cm de la punta distal y colóquela en un tubo o envase estéril sin medio de cultivo.

Transporte inmediatamente al laboratorio para prevenir la desecación.

Catéteres intra venosos aceptables para cultivos semi-cuantitativos son: Catéter central, catéter venoso periférico, catéter arterial, catéter umbilical, catéter de hiperalimentación, catéter Swan-Ganz.

LÍQUIDO CEFALÓRRAQUIDEO:

Asépticamente desinfecte con tintura de yodo al 2%.

Inserte una aguja con estilete en el inter espacio L3-L4, L4-L5 (niños) o L5-S1.

Mida la presión del líquido.



Coleccione de 1 – 3 ml de LCR en 4 tubos estériles previamente rotulados.

Ordene en los tubos: Química, celularidad, frotis, cultivo, aglutinaciones.

Si no logra obtener suficiente líquido, envíe lo colectado al laboratorio de microbiología primero.

Envíe inmediatamente al laboratorio.

Nunca refrigere el líquido cefalorraquídeo.

En la requisición con los datos del paciente indique la edad y si ha habido antibioterapia previa.

ULCERA DE DECÚBITO:

Limpie la superficie con agua jabonosa y solución salina estéril.

Tome una muestra de biopsia de tejido o un aspirado con jeringuilla de la lesión.

Un hisopo no es la mejor escogencia para colectar la muestra, sin embargo, cuando no es posible de otra forma, presione vigorosamente el palillo en la base de la lesión para tomar la muestra.

OÍDO:

La timpanocentesis está reservada para casos complicados, recurrentes, que no responden a la antibioterapia y otitis media crónica.

El espécimen de escogencia es un aspirado del tímpano, ya que éste fluido representa el proceso infeccioso, no así la flora del canal externo del oído.

El hisopo no es recomendado para la colección de muestra para diagnosticar otitis media, ya que puede contaminarse con la flora externa. Solo en caso de ruptura del tímpano, se puede usar el hisopo para recoger el líquido.

En éste caso se debe limpiar previamente con un antiséptico el canal del oído externo.



Indique en la orden médica si se trata de secreción de oído interno, o externo o líquido de timpanocentesis.

No refrigere la muestra.

No solicite cultivo por anaerobios.

Transporte la muestra rápidamente al laboratorio.

OJOS:

Tome muestra de cada ojo con diferentes hisopos previamente humedecidos con solución salina estéril, rotando el algodón por la superficie de la conjuntiva.

Esto es independiente de que solo un ojo esté infectado, ya que la muestra del ojo sano puede servir de control de la flora normal del paciente, y compararlo con el reporte del ojo infectado.

Indique en la muestra, en los medios enviados y en la orden médica, si es ojo derecho o izquierdo en cada caso.

Inocule directamente en medios de agar Chocolate, agar Sangre, Sabouraud-Dextrosa agar y Thioglicolato.

Utilice otro hisopo para coleccionar muestra para frotis, el cual debe ser inmediatamente colocado en la placa.

En el caso de raspado corneal, el método es el mismo, solo que se utiliza una lanceta o aguja estéril para realizar el raspado de la lesión y se adiciona una placa para frotis por KOH.

No utilice el término " ojo " o " ocular " para identificar la muestra. Sea más específico al describirla: Secreción conjuntival, secreción corneal, secreción acuosa o vítrea, etc.

HECES:



Coloque la muestra dentro de un envase limpio, con cierre hermético y no necesariamente estéril. No solicite frotis por Gram.

No cultive si la muestra es dura o bien formada a menos que se trate de control para trabajo (portador sano).

No se recomienda el uso de Culturette, salvo para infantes y pacientes con diarrea activa. Si lo utiliza, recolecte más de 2 g de muestra.

Para estudios por Rotavirus y *Clostridium difficile*, envíe solo muestra diarreica, y no utilice hisopo.

LIQUIDOS CORPORALES: LIQUIDO PERITONEAL, ASCITICO, BILIS, SINOVIAL, PERITONEAL, PERICARDICO, PLEURAL Y TORACICO:

Desinfecte el área con tintura de yodo al 2%.

Obtenga la muestra vía aspiración con aguja percutánea o cirugía.

Transporte inmediatamente al laboratorio.

Puede enviar la muestra para cultivo inoculándola en una botella para hemocultivos. Anótelo en el rótulo.

Siempre envíe una apropiada cantidad de líquido, dependiendo de las pruebas que requiera.

Nunca envíe la muestra en hisopo.

LÍQUIDO AMNIÓTICO:

Coleccione por aspirado vía amniocentesis, cesárea o catéter intrauterino.

La aspiración de la secreción vaginal no es aceptable debido a contaminación por la flora vaginal normal.

Puede enviar en un tubo estéril o en un sistema de transporte para anaerobios.

SECRECIÓN DE GLÁNDULA DE BARTHOLINO:



Limpie los genitales externos con agua y jabón y descarte el exceso de secreción.

Pus del absceso de la glándula puede ser colectado por palpación digital del ducto.

Solicite frotis y cultivo por Gonococos.

Aspire el líquido del ducto preferiblemente con aguja y jeringuilla.

Puede utilizar un sistema de transporte para anaerobios.

CERVICAL O ENDOCERVICAL:

Visualice el cérvix utilizando un especulo sin lubricante. Limpie el excedente de secreción.

Remueva la mucosa y secreción del canal con un hisopo y descártelo.

Con un nuevo hisopo estéril de alginato de calcio, dacrón o algodón no tóxico, obtenga muestra del canal endocervical.

Preferiblemente inocule la muestra en un plato de Thayer-Martin y el resto envíelo al laboratorio.

Con otro hisopo colecciona muestra para colocarla en una placa para frotis.

Un cultivo anal puede ser colectado para acompañar la muestra cervical cuando se sospecha *N.gonorrhoeae*, ya que el recto podría ser el único sitio positivo

Post-tratamiento.

No refrigere la muestra. Envíe pronto al laboratorio de microbiología.

VAGINAL:

El cultivo rutinario de secreción vaginal no es apropiado debido a la presencia de alto número de microorganismos saprofitos en el área que hacen difícil la interpretación del cultivo.

Descarte el exceso de secreciones externas.



Obtenga la secreción de la mucosa vaginal con un palillo estéril no tóxico o con una pipeta.

Con otro palillo obtenga una muestra y colóquela en una placa para frotis directo. Esta placa puede servir también para confirmar Vaginosis bacteriana, candidiasis vaginal o Trihcomoniasis.

No se realiza cultivo por anaerobios.

SECRECIÓN URETRAL DAMAS:

Colecte la muestra al menos 1 hora después que el paciente haya orinado.

Remueva el exudado del orificio uretral.

Colecte la descarga de material en un hisopo no tóxico por masaje de la uretra.

Si no hay descarga, lave la uretra externa con jabón y enjuague con agua. Inserte un hisopo 2 a 4 cm dentro de la uretra y rote el palillo.

Envíe la muestra rápidamente al laboratorio.

SECRECIÓN PROSTÁTICA:

Colecte la muestra al menos 1 hora después que el paciente haya orinado.

Limpie el meato urinario con jabón antiséptico y agua.

Proceda a masajear la próstata a través del recto.

Coleccione el fluido en un hisopo estéril y no tóxico o en un tubo estéril.

También es muy útil para recuperar gonococos el cultivo de orina después del masaje prostático.

SECRECIÓN URETRAL VARONES:

Colecte la muestra al menos 1 hora después que el paciente ha orinado.

Inserte un hisopo urogenital 2-4 cm dentro del lumen de la uretra.



Rote el hisopo.

Preferiblemente inocule directamente en un medio de Thayer-Martin.

Utilice otro hisopo para tomar muestra para el frotis directo.

La placa debe ser hecha en el sitio.

No refrigere la muestra.

Envíe rápidamente al laboratorio. Solicite antígenos por Chlamydia y cultivo por Micoplasmas.

No se realiza cultivos para anaerobios.

NASAL:

Inserte un hisopo humedecido con solución salina estéril +/- 2 cm dentro de la fosa nasal.

Rote el hisopo contra la mucosa nasal. Colóquelo en un medio de transporte.

Envíe al laboratorio.

El cultivo de la fosa nasal anterior, solo está reservado para la detección de portadores de *Staphylococcus aureus* y/o Estreptococos beta-hemolíticos o en caso de lesión.

No refrigere la muestra.

El cultivo nasal no predice el agente etiológico de infecciones en oído medio o el tracto respiratorio inferior.

No cultive por anaeróbios.

NASOFARÍNGEO:

La muestra debe ser tomada evitando la contaminación con la flora nasal u oral.



Lentamente inserte un hisopo de alginato de calcio dentro de la nasofaringe posterior, vía fosas nasales. Puede usar un espejo nasal.

Rote lentamente el hisopo para absorber secreción.

Inocule en medios de agar sangre y agar chocolate en el sitio o envíe al laboratorio.

La muestra nasofaríngea es muy útil para detectar portadores de Meningococos o en caso de sospecha de tos ferina.

El cultivo rutinario de la nasofaringe no es recomendado.

FARINGE:

Utilizando un depresor lingual presione la lengua hacia abajo para observar los pilares de la faringe y el área tonsilar para localizar el área de inflamación y exudado.

Utilizando un hisopo de alginato de calcio o de dacrón, rote el mismo sobre el área de exudado, las tonsilas y faringe posterior.

No toque el resto del área de la cavidad oral o los dientes.

Envíe al laboratorio.

Si el transporte demora, refrigere el Culturette hasta por 1 hora.

No solicite frotisdirecto de faringe.

Indique si requiere cultivo o prueba directa de detección de antígenos.

Indique si hay sospecha de otro patógeno diferente a *Streptococcus beta hemolítico*(Ejemplo *N. Gonorrhoeae*).

El cultivo de faringe está contraindicado en pacientes con epiglotis inflamada.

ESPUTO POR EXPECTORACIÓN:

El esputo podría no ser la muestra apropiada para determinar el agente etiológico de neumonía bacteriana. La sangre, el lavado bronquial o el aspirado transtraqueal son más seguros.



Es recomendable que la muestra sea tomada en la mañana al levantarse.

Haga que el paciente se enjuague la boca con agua antes de expectorar, para remover la flora superficial oral.

Si el paciente tiene dentadura postiza, se la debe quitar.

Instruya al paciente para que tosa con fuerza y profundo, tal que obtenga un esputo que provenga del tracto respiratorio inferior. Explíquelo que es el esputo.

Depositarlo directamente en un envase estéril. No colecte saliva ni fluido post-nasal. Ordene un frotis por Gram para confirmar la validez del esputo.

Para pacientes pediátricos que no pueden producir la muestra apropiada, un terapeuta respiratorio puede coleccionar la muestra por succión.

Si la muestra no puede ser llevada al laboratorio, puede refrigerarse.

Indique en la orden médica los microorganismos de interés, ya sea por bacterias, hongos o mico- bacterias, cada una con un formulario diferente.

Para el diagnóstico de la tuberculosis coleccionar 2 muestras en días consecutivos.

ESPUTO INDUCIDO:

Haga que el paciente se enjuague la boca con agua.

Con ayuda de un nebulizador, haga que el paciente inhale aerosoles de una solución salina estéril al 3-10%.

Colecte el esputo inducido en un envase estéril.

ASPIRADO TRAQUEAL:

Colecte el espécimen a través de una traqueotomía o tubo endotraqueal.

Con cuidado pase el catéter de polietileno a través del sitio dentro de la tráquea.

Aspire el material de la tráquea utilizando una jeringuilla o un seccionador intermitente.



Remueva el catéter y descarte la jeringuilla.

Envíe al laboratorio.

No refrigere la muestra.

ASPIRADO TRANSTRAQUEAL:

Utilice este método cuando su resultado puede influir grandemente en la terapia, cuando los procedimientos no invasivos no han sido productivos, cuando la infección no está siendo controlada, cuando se sospeche infección por anaerobios o cuando el paciente está comatoso.

Anestesia la piel del sitio de la colección y prepare asépticamente el área.

Inserte una aguja calibre 14 a través de la membrana tiroidea.

Pase un catéter de polietileno calibre 16 a través de la aguja hacia la tráquea inferior.

Remueva la aguja.

Aspire la secreción con una jeringuilla de 20 ml o un seccionador.

Si la secreción es escasa, inyecte lentamente de 2 a 4 ml de solución salina estéril para inducir la tos, lo que usualmente produce un adecuado espécimen.

Envíe el envase colector con el tubo incrustado al laboratorio prontamente.

Evite la entrada de aire al envase colector.

No refrigere la muestra.

MUESTRA POR BRONCOSCOPIA:

Colecte el espécimen vía broncoscopio.

El cepillado bronquial es preferido al lavado, ya que el lavado es más diluido.

Anestesia el área con Lidocaína tópica al 2% preferiblemente.

Haga que el paciente inhale por la boca y exhale por la nariz.



Lubrique ambas fosas nasales con Xylocaina en jalea.

El paciente pudiera necesitar Demerol intravenoso para tolerar el broncoscopio.

Lubrique el broncoscopio con Xylocaina al 2% en jalea, evitando tocar la punta distal.

Introduzca el broncoscopio intra-nasalmente.

PARA LAVADO BRONQUIAL

Sujete una trampa de Lukens al broncoscopio.

Introduzca 10 ml de solución salina no bacteriostática a través del canal abierto.

Succione el material desde afuera.

Selle el tubo de la trampa y envíe al laboratorio.

PARA CEPILLADO BRONQUIAL

Utilice un broncoscopio de doble lumen.

Inserte la brocha citológica dentro del canal abierto del broncoscopio y avance.

Empuje la brocha fuera de su protector y realice el cepillado.

Jale la brocha hacia dentro de su protector y remueva la unidad de brocha completa.

Coloque la brocha dentro del tubo de transporte conteniendo solución salina o

Ringer's lactato.

Recuerde que la brocha se seca al aire rápidamente, lo cual es negativo para el cultivo

Envíe al laboratorio inmediatamente.

Si desea estudio por Micobacterias, puede colocar la brocha dentro de un tubo conteniendo 10 ml de caldo de Middlebrook 7H9.



PARA LAVADO BRONQUIO-ALVEOLAR (BAL):

Sujete una trampa de espécimen de 70 ml al broncoscopio.

Introduzca 100 ml de salina no bacteriostática a través del canal en porciones de 20 ml.

Después de la tercera o cuarta inyección de salina, reemplace la trampa de 70 ml por una de 40 ml.

Envíe las trampas al laboratorio o 10 ml de líquido de cada una en tubos estériles.

COMENTARIO: El mayor problema con el lavado bronquial, es la inhibición de las bacterias por la solución anestésica.

El cepillado bronquial solamente obtiene 0.001 ml de muestra, por lo que la brocha debe ser rápidamente colocada en el líquido de transporte para evitar la desecación.

La muestra colectada vía broncoscopio puede ser fácilmente contaminada con la flora oral. Esto puede reducirse utilizando un broncoscopio de triple lumen.

El lavado bronquio alveolar es preferido especialmente cuando el cultivo de esputo no ha sido satisfactorio.

El análisis cuantitativo de la muestra por lavado bronco alveolar, es clínicamente más relevante que el análisis de la muestra de esputo.

ORINA POR VACIADO DIRECTO:

Se recomienda recoger la primera orina de la mañana al despertar.

Lave los genitales con jabón y abundante agua. Secar con un paño limpio.

Dejar escapar la primera porción de orina y a continuación recoger la muestra directamente en un envase estéril.



Enviar inmediatamente al laboratorio. Si no se puede, refrigerar la orina hasta por 2 horas.

No utilizar orina de receptáculos.

NO utilizar orina de pool de 24 horas.

No solicitar cultivo por anaerobios.

El frotis directo por Gram de orina de mujeres recolectadas por vaciado directo, no es del todo confiable, ya puede estar contaminado por microorganismos de la flora normal vaginal.

ORINA POR CATETERIZACIÓN:

Limpie la porción del catéter donde se va a tomar la muestra de orina con alcohol etílico al 70 %.

Inserte la aguja dentro del catéter y colecte la orina dentro de la jeringuilla.

Transfiera la orina a un envase estéril.

Enviar inmediatamente al laboratorio. En caso contrario refrigerar la orina.

La colección de la orina por cateterización uretral tiene algún riesgo de forzar hacia la vejiga, parte de la flora normal uretral durante la inserción del catéter.

Nunca recoja orina de la bolsa del catéter.

No desconecte el catéter de su bolsa durante la colección de la muestra.

Paciente con catéter por 48h – 72h pueden ser colonizados con múltiples cepas bacterianas.

Indique en la orden médica si la orina ha sido colectada por catéter.

ORINA POR ASPIRACIÓN SUPRAPÚBICA:

Mediante técnicas asépticas descontamine y anestesia el área de la punción.



Introduzca la aguja calibre 22 dentro de la vejiga entre el pubis y el ombligo.

Aspire alrededor de 20 ml de la vejiga y transfiera la orina asépticamente a un envase estéril o tape la aguja y envíe la jeringuilla.

Enviar inmediatamente al laboratorio, o refrigerar.

Esta técnica evita la contaminación de la orina por microorganismos de la uretra o perianales.

Es útil cuando se sospecha infección por anaerobios, en pacientes pediátricos si hay problema en la colección de la orina, pacientes con trauma en la médula espinal y en general en aquellos en que el método del vaciado directo o cateterización no ha sido posible.

Indique en la orden médica cuando la orina ha sido colectada por punción supra púbrica.

Áreas normalmente estériles, productoras de secreciones en cuadros de origen bacteriano:

Vejiga, uréter, riñón, glándulas salivares, tracto respiratorio bajo, senos frontales y para-nasales.

Líquidos orgánicos normalmente estériles.

Sangre, líquido céfalo raquídeo, líquidos articulares, líquido pericardio, líquido pleural.

médula ósea.

TRANSPORTE DE LA MUESTRA

La mayoría de las especies bacterianas son vulnerables a demoras en su procesamiento, cambios de temperatura, humedad, etc. Durante el transporte las bacterias de rápido crecimiento, pueden crecer sobre los patógenos más fastidiosos



y de crecimiento lento o con requerimientos especiales, por lo que es vital en el éxito del cultivo que la muestra sea transportada y procesada con la celeridad necesaria.

Todas las muestras deben ser enviadas inmediatamente al laboratorio después de colectadas. Se debe instruir al personal médico, de enfermería y mensajeros en la importancia de un transporte expedito de las muestras clínicas.

En los casos en que el transporte o el procesamiento pudieran demorar, se establecen a continuación las condiciones de temperatura para algunos tipos de muestras:

MANTENIMIENTO A 4 °C:

Tejido de autopsia, lavado bronquial, catéter intra venoso, biopsia de pulmón, líquido pericárdico, esputo, orina., quemaduras, oído externo.

MANTENIMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE:

Muestras de LCR, Líquido sinovial, abdominal y amniótico, bilis, aspirado de pulmón, lesión, placenta, nasal, aspirado transtraqueal, orina supra púbica, raspado corneal, sangre, humor vítreo, médula ósea, cérvix, conjuntiva, genitales, heces, nasofaríngeo, tracto respiratorio superior., heridas, cultivos por anaerobios, ocular, genital, oído interno.

En general no guarde una muestra por más de 24h bajo ninguna condición.

Sin embargo, los virus permanecen estables por 2 a 3 días en medios de transporte apropiados.

El transporte óptimo de la muestra depende en gran parte del volumen obtenido. Mientras menor sea su volumen, con mayor rapidez debe transportarse.

Microorganismos sensitivos a las condiciones ambientales, como *N.meningitidis*, *N. Gonorrhoeae* y *H influenzae* se recomienda sembrar directamente en platos en el sitio de colección de la muestra.



Si se anticipa que habrá demora en el envío de la muestra o si el cultivo ha de ser enviado a otro laboratorio, se recomienda utilizar medios de transporte adecuados como Stuart, Amies o Cary-Blair. No enviar hisopos.

Tenga en cuenta que los medios de transporte están formulados para mantener la viabilidad de los microorganismos, sin embargo, algunos podrían no sobrevivir en un medio pobre en elementos nutricionales específicos.

Siempre que sea posible, las muestras deben ser enviadas directamente y en forma inmediata al laboratorio de microbiología, sin utilizar las áreas de recibo central u otros departamentos del laboratorio.

CRITERIOS DE RECHAZO DE MUESTRAS CLÍNICAS:

El personal del laboratorio debe tener siempre presente que los especímenes clínicos que son enviados para su evaluación, representan elementos de suma importancia en la detección, evaluación y control de enfermedades potencialmente peligrosas que aquejan al paciente y que la rapidez y eficiencia con que se logre obtener información de utilidad clínica de las mismas, tendrá repercusiones directas en la salud del paciente, el manejo racional y adecuado de los recursos del laboratorio, la seguridad del resto de los pacientes y el personal que allí labora, el control de los antibióticos, el tiempo de hospitalización, disminución de costos de operaciones y en general la credibilidad del laboratorio y el hospital en general.

Por todo lo anterior las muestras que son recibidas por el laboratorio, deben ser apropiadamente colectadas, transportadas y procesadas. Estas muestras deben representar la causa probable de infección, de lo contrario el procesamiento y reporte de muestras no adecuadas puede proveer información equivocada, lo cual puede llevar a un mal diagnóstico y por consiguiente fallas en el tratamiento que puede poner en peligro la vida del paciente.

Consecuentemente, el laboratorio debe poner en ejecución una política estricta de aceptabilidad y rechazo de muestras clínicas.



Causales de rechazo de muestras clínicas:

- Muestras no rotuladas o sin identificación.
- Discrepancia en la identificación del paciente y la muestra.
- Envase inapropiado o medio de transporte inadecuado.
- Demora prolongada en enviar la muestra al laboratorio.
- Duplicación de muestra del mismo paciente dentro de 24h, excepto sangre.
- No indicar tipo de muestra o procedencia, No indicar tipo de examen en la orden.
- Muestra con preservativos, Muestra derramada o rotura del envase. Hisopos secos.
- Un solo Culturette con múltiples órdenes. Muestra para anaerobios en envase inapropiado. Cultivo por anaerobios de muestras con flora anaeróbica normal.
- Frotis de Gram por *N. gonorrhoeae* de muestras de cérvix, vagina y cripta anal, ya que pueden haber Neisserias saprófitas en el área.
- Cultivo por anaerobios de orina colectada por vaciado directo. Orina colectada de la bolsa del catéter.
- Saliva. Frotis directo por Gram de hisopos.
- Volumen inadecuado.
- Contaminación obvia de la muestra.

Nota: El rechazo de una muestra debe estar acompañado de la solicitud de un nuevo espécimen. Es conveniente notificarlo directamente al médico solicitante.

MUESTRAS DESAPROBADAS DEBIDO A SU CUSTIONABLE INFORMACIÓN CLÍNICA:

Hisopo superficial oral. Hisopo de úlcera de decúbito, Hisopo de úlceras varicosas, Hisopo de lesión superficial gangrenosa, Contenido de vejiga, Vómito, Punta de



catéter Foley, Descarga de colostomía, Loquios, Aspirado gástrico de recién nacido, Frotis faríngeo, nasal, orina o heces.

Muestras no adecuadas para cultivo por anaerobios:

- Lavado bronquio alveolar desprotegido.
- Hisopo cervical.
- Aspirado endotraqueal.
- Loquios.
- Hisopo nasofaríngeo / Secreción faríngea.
- Líquido seminal o prostático.
- Espujo por expectoración o inducido.
- Heces o muestra rectal. Secreción uretral / hisopo vaginal o vulvar. Orina por vaciado directo o catéter.

PRIORIDAD DE LAS MUESTRAS:

Todas las muestras deben ser procesadas lo más rápidamente posible al llegar al laboratorio. Sin embargo, su manejo puede ser clasificado de la siguiente manera, independientemente de su orden.

MUESTRAS URGENTES

- Sangre.
- LCR. (Su estudio tiene Prioridad sobre cualquier otra muestra o trabajo).
- Aspirado transtraqueal
- Líquido pericárdico.
- Líquido amniótico.
- Tracto respiratorio inferior.



- Muestras quirúrgicas de la sala de CIC.
- Líquido articular (Artritis séptica).
- Biopsia de Pulmón.

Nota: Cuando estas muestras se encuentran rotuladas con la advertencia "Stat" o "Urgente", los resultados deben ser informados telefónicamente al médico solicitante.

-Las muestras sospechosas de contener microorganismos anaerobios estrictos, deben ser colocado en un tubo libre de oxígeno o en medio de caldo de carne con glucosa.

-El obtener muestras directamente del sitio infectado es muy importante para que sea representativa del proceso infeccioso. Algunas muestras son obtenidas por biopsias o procesos quirúrgicos, por ejemplo, las de pulmón, hígado y tracto gastrointestinal.

PRÁCTICA N°2 MÉTODOS PARA LA ELABORACIÓN DE ANTIBIOGRAMAS

I. INTRODUCCIÓN

A partir del descubrimiento de los antibióticos en 1920 y su posterior introducción en la terapéutica de las enfermedades infecciosas, en la década del 30 del pasado siglo, el devenir histórico del proceso de estudio de la sensibilidad de los microorganismos a estos agentes puede ser enmarcado en diferentes etapas. La frecuente falla en los tratamientos empíricos con antibióticos. Pone de manifiesto la necesidad de realizar pruebas para definir la sensibilidad o resistencia de los microorganismos a determinados fármacos.

En general, se entiende por antibiograma el resultado de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* llevadas a cabo para conocer el comportamiento de



un microorganismo frente a determinados antibióticos, cuyos resultados se expresan en términos de "sensibilidad" y "resistencia".

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Adquirir destrezas en la realización de antibiogramas para conocer su utilidad en el diagnóstico clínico.

Objetivos específicos:

- Comprender el fundamento del antibiograma, preparación y posibles fuentes de error en su realización.
- Realizar una buena elección del antimicrobiano para el posterior tratamiento de infecciones.
- Identificar cuando una bacteria es resistente, sensible o presenta sensibilidad intermedia.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El laboratorio de microbiología con sus procedimientos provee la información útil a tiempo para poder controlar los procesos infecciosos y así evitar riesgos en la vida del paciente.

El tratamiento adecuado de las infecciones depende de:

- El foco o sitio de infección.
- El conocimiento del agente etiológico.
- La susceptibilidad de los microorganismos a las drogas antimicrobianas y que la droga de lesión alcance niveles terapéuticos en el sitio de la infección.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Mecheros



- Hisopos estériles.
- Medios de Mueller Hinton.
- Caldos nutritivos.
- Discos de sensibilidad.
- Incubadora a 37 C°
- Pinzas.

V. MUESTRA

- Cepas de *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, y Enterobacterias.

VI. PROCEDIMIENTO

Existen diferentes métodos para determinar la sensibilidad bacteriana a las drogas. Entre las técnicas más conocidas se encuentra:

El método de dilución, donde se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI).

El método de difusión disco placa (método Kirby –Bauer).

Método de dilución

Con este método se puede determinar la mínima concentración del antibiótico necesaria para eliminar o impedir el crecimiento de una bacteria.

preparan diluciones seriadas de antibióticos, adicionándolas a una serie de tubos con medio de cultivo líquido, como caldo de Mueller Hinton o de TripticasaSoya previamente esterilizado.

Nota: Se prepara un número de tubos igual al número de concentraciones de antibióticos que se quieren evaluar.



- Se inocula cada tubo con una suspensión conocida y constante del microorganismo que se le va a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Difusión en Agar (Método de Kirby –Bauer).

- En un tubo con 4 a 5 ml de caldo nutritivo se le agregan colonias aisladas de un cultivo de no as de 24 horas del microorganismo, se compara la turbidez con el tubo de la escala turbidimétrica 0,5 de Macfarlán.
- Con un escobillónestéril se moja en el medio diluido exprimir el exceso de líquido en la pared del tubo.
- Sembrar en medio de Mueller en cuatro planos diferentes hasta cubrir la totalidad de la caja de Petri.
- Tapar la caja y dejar en reposo por 5 minutos para permitir la absorción del exceso de líquido.
- colocar los discos de sensibilidad equidistantes, máximo 5 discos. Los sensidiscos deben quedar a 15 mm de la orilla de las cajas y a 30 mm de otro sensidisco.
- Incubar por 24 horas y luego medir los halos de inhibición con una reglilla milimetrada, midiendo el diámetro total del halo y compararlo con las tablas estándar de halo para cada antibiótico. (Tabla N° 1)

Tubo patrón de la escala turbidimétrica de Macfarlán: Su turbidez corresponde a 1.5×10^8 microorganismo viables x ml. Se prepara mezclando 0,5 de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ al 1.75% con 99,5 de H_2SO_4 0,36 N al 1 % se agita suavemente y se distribuye en tubos 6-8 ml en tubos tapa rosca. Se conservan a temperatura ambiente protegidos de la luz.

Nota: El patrón debe prepararse cada 6 meses.



VII. TALLER DE PREGUNTAS

Investigar: concepto de Sinergismo, Antagonismo.

¿Cuáles son las principales causas de error al realizar un antibiograma y como pueden repercutir en la lectura de los resultados? (ver tabla 1.)

OBSERVACIONES:

- El disco de Ampicilina se utiliza para pruebas de sensibilidad a las Ampicilinas y la Amoxicilina.
- El disco de Cefalotina registra sensibilidad para todas las Cefalosporinas de 1º generación como Cefalotina, Cefaloridina. Cefalexina, Cetapirina, CefadroxilCefradina.
- El disco de Clindamicina se utiliza para probar la sensibilidad tanto a la Clindamicina como a la Lincomicina.
- El disco de Meticilina se utiliza para determinar la sensibilidad a todas las penicilinas resistentes a penicilinasa (es decir MeticilinaCloxacilina, Dicloxacilina y Oxacilina).
- El disco de Oxacilina de un microgramo puede utilizarse para probar la sensibilidad o resistencia del *S. pneumoniae* a la Penicilina.
- El disco de Penicilina G se utiliza para determinar la sensibilidad a todas las Penicilinas susceptibles a la penicilinasa.
- El disco de Tetraciclina se utiliza para determinar la sensibilidad a todas las Tetraciclinas (es decir Clortetraciclina, Doxiciclina, Oxitetraciclina, Minociclina y Tetraciclina). Algunos microorganismos resistentes a la Tetraciclina pueden ser sensibles a la Minociclina.

Con el fin de proporcionar series selectivas de antimicrobianos en un proceso infeccioso determinado, se enumeran en la tabla No. 2, como una sugerencia, varios grupos de antimicrobianos.



Tabla N°1. SUGERENCIAS PARA EL USO DE ANTIMICROBIANOS

<i>Staphylococcus spp</i> <i>Streptococos del grupo viridans</i>	
Metilina u Oxacilina de 5mcg	Penicilina G
Eritromicina	Clindamicina o Lincomicina
Amino glucósido (Gentamicina, Netilmicina Amikacina	Eritromicina
Lincomicina o Clindamicina	Cefalosporina de primera y segunda generación
Trimetropinsulfa	Vancomicina
Vancomicina	Tetraciclina
En infecciones urinarias	
Norfloxacin	
Nitrofurantoina	
Ácidonalidixico	
Sulfametosazole	
<i>Enterococcus sp</i>	<i>Enterobacterias</i>
Penicilina	Amino glucósido
Ampicilina	Ampicilina
Eritromicina	amoxicilina
Clindamicina o lincomicina	Cefalosporina de 1º generación



Cefalosporina de primera y segunda generación Infecciones urinarias Norfloxacin Nitrofurantoina Ácidonalidixico Sulfametosazole	Cefalosporina de 2º generación Cefalosporina de 3º generación Trimetropin -Sulfa Quinolona Infecciones urinarias Nitrofurantoina Ácido nalidixico Norfloxacin Trimetropinsulfa
<i>Pseudomonasspp</i>	
Aminglucósido Piperacina Carbenicilina Cefoperazona o Ceftazidime Quinolona Astreonam Imipenem o Meropemem Sulperazona	

Nota: Los *Estafilococos* resistentes a Oxacilina son resistentes a todas las penicilinas a Betalactámicos (Cefalosporinas, Carbapenemas).



PRÁCTICA N° 3 PIEL Y SUS ANEXOS

I. INTRODUCCIÓN

Muchos tipos de bacterias pueden infectar la piel. Las más frecuentes son los *Staphylococcus* y los *Streptococos*. Las infecciones de la piel causadas por bacterias menos comunes pueden contraerlas las personas ingresadas en hospitales o en residencias, así como las que trabajan en jardinería, o simplemente las que nadan en un estanque, un lago o en el mar. Para investigar el origen infeccioso se debe realizar un cultivo.

II. OBJETIVOS

Objetivos generales:

- Desarrollar habilidades en el manejo de los cultivos de piel y sus anexos
- Estudiar los procesos normales y patológicos de la piel y sus anexos.

Objetivos específicos:

- Conocer la flora normal de la piel y sus anexos.
- Realizar cultivos de secciones de piel y reconocer los agentes patógenos involucrados en cada caso.
- Diferenciar entre un cultivo de piel normal y uno patológico.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS :

La piel y sus anexos son la primera barrera que el cuerpo utiliza contra las bacterias que provocan infecciones. Aunque muchas bacterias viven en la superficie de nuestra piel (hospedera), una piel saludable puede usualmente protegernos de las



infecciones. Sin embargo, las infecciones bacterianas de la piel pueden afectar una zona restringida o pueden propagarse y afectar una zona extensa.

En el estudio de las enfermedades de la piel, así como la de otros órganos, el laboratorio tiene una importancia fundamental para el diagnóstico preciso.

El examen directo de las muestras permite documentar la presencia del microorganismo en la lesión.

- Áreas del cuerpo que normalmente son hospederas de flora normal:

1-Piel y mucosas.

2-Conjuntiva.

3-Nasofaringe, oro faringe, cavidad oral.

4-Conducto auditivo externo.

5-Tracto gastro intestinal bajo.

6-Genitales externos.

7-Uretra anterior.

8-Vagina –endocervix.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Escobillones estériles.

- Agar Sangre.

- Agar EMB u otro medio selectivo para *Entero bacterias*.

Agar azida (agar sangre con inhibidor para gérmenes Gram negativos).

-Mecheros.

- Incubadoras.



V. MUESTRAS:

Secreciones de abscesos de piel y diferentes muestras relacionadas con la piel o sus anexos.

VI. PROCEDIMIENTO:

Las muestras de piel deben ser obtenidas de varias de las lesiones que se observen, después que hayan sido desinfectadas con jabón quirúrgico y solución salina estéril. Si la lesión es cerrada la muestra se toma con jeringa por aspiración, en caso de exudados debe descartarse el material de la superficie y tomar la muestra de la parte interna para el análisis bacteriológico.

La presencia de abscesos, heridas y úlceras supurativas constituyen los principales focos infecciosos a nivel de tejidos blandos.

- Las muestras si no son tomadas directamente en el laboratorio o si no se van a procesar inmediatamente deben ser colocadas en un medio de transporte. Debe realizarse una tinción de Gram, para observar morfología bacteriana y la reacción PMN.
- Para realizar el cultivo sembramos la muestra en los diferentes medios y se incuban x 18-24 horas.
- Revisar los cultivos y analizar los diferentes tipos de colonias y realizamos Gram. De estas para definir los procedimientos de identificación que se deban realizar, si se sospecha que el microorganismo es patógeno se procede a realizar antibiogramas.

VII. TALLER

- ¿Cuáles son los microorganismos que frecuentemente producen infecciones de la piel y cómo se llama cada una de estas patologías según presentación clínica y agente etiológico?



- Elabore un informe de sus resultados y correlacione estos con los datos clínicos del paciente.
- Investigue sobre otros microorganismos que producen lesiones en piel y ¿cómo se diagnostican por el laboratorio de Microbiología?

PRÁCTICA N°4 ENFERMEDADES DEL TRACTO RESPIRATORIO

DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO

I. INTRODUCCIÓN:

El aparato respiratorio es un conjunto de estructuras, que sirven para llevar a cabo la tarea de la respiración, entendiendo por respiración todos aquellos pasos necesarios para conseguir que el oxígeno atmosférico consiga penetrar hasta la última de las células del organismo, y eliminar el CO₂ resultante. Las infecciones del aparato respiratorio se constituyen en un problema de salud pública a nivel mundial por las altas tasa de mortalidad y morbilidad, El laboratorio clínico juega un importante papel en el diagnóstico de estas patologías.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Desarrollar habilidades en el procesamiento de los cultivos de faringe, esputos, muestras bronquiales y en los diferentes métodos de diagnóstico a través del laboratorio de Microbiología.

Objetivos específicos:

- Identificar la flora normal de las vías respiratorias superiores (garganta, senos paranasales).
- Identificar los diferentes microorganismos involucrados en faringitis, bronconeumonías con diferentes pruebas de identificación para cada caso.



- Realizar las pruebas específicas para investigar *Mycobacterium* y otros agentes patógenos.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Las vías respiratorias altas (nariz, boca, faringe) contienen una flora hospedera la cual no hace ningún daño a los individuos inmuno-competentes. Estos órganos pueden llegar a ser afectados por virus, bacterias patógenas u hongos y causar enfermedad

Actualmente uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo según la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) es la elevada prevalencia de bacterias causantes de enfermedades en humanos.

Es importante para el bacteriólogo en su hacer clínica saber diferenciar la flora hospedera de la patógena, para realizar una buena ayuda diagnóstica al clínico.

El cultivo de muestras respiratorias tiene como principal objetivo, detectar los casos de infecciones estreptocócicas y casos producidos por microorganismos poco usuales pero tratables.

El tracto respiratorio inferior bronquios bronquiolos, pulmones son usualmente estériles y cuando las bacterias los invaden se producen infecciones que pueden llevar a la muerte si no son tratadas a tiempo. Lo ideal es aislar el agente causal, pero esto se logra solo en la mitad de los casos. Al valor del estudio del esputo es discutido pero importante pues permite un diagnóstico en caso de una flora predominante

La tinción de Gram del esputo se considera la muestra adecuada si tiene menos de 10 células epiteliales y más de 20 leucocitos por campo de bajo poder y una flora predominante.

Para la investigación de infecciones por Micobacterias se debe realizar ZN de esputo y cultivos en medio de Ogawakudo o lowenstein-jensen previa



descontaminación de la muestra con NaOH al 4 %; otras muestras cepillado bronquial lavado bronquio-alveolar, aspirado pulmonar

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Agar Sangre.
- Agar Chocolate.
- EMB (u otro medio que lo remplace).
- Manitol.
- Colorantes de Gram y ZiehlNeelsen.
- Láminas porta objetos.

V. MUESTRAS:

- Secreción de orofaringe.
- Secreción nasofaringe.
- Esputos.

VI. PROCEDIMIENTO:

- Las muestras de faringe deben ser obtenidas con un escobillón de algodón o de dacrón, y con ayuda de un baja lenguas para evitar la contaminación con saliva, la muestra se toma de la parte posterior de la faringe o de cualquier zona ulcerativa, exudativa o encapsulada que se observe. La muestra se coloca en medio de transporte hasta ser procesada.



- Sembrar la muestra en los medios de cultivo por agotamiento e incubar de 18-24 horas en atmósfera de CO₂ a 37 grado centígrados.

Lectura: Observar si hay presencia de colonias beta hemolítica, anotar como:

- 1-10 colonias: crecimiento escaso, 10-20 colonias: crecimiento moderado, más de 20 colonias: crecimiento abundante.

- Aislarlas colonias beta hemolítica, en agar Sangre y colocar un disco de Bacitracina de 0,04 unidades.
- A las 24 horas de incubación observar la presencia de un halo de inhibición.
- Si hay halo se reporta *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A.
- Si no presenta halo se reporta *Estreptococos* beta hemolítico diferente del grupo A.

Los *Estreptococos* beta hemolíticos no A es recomendable clasificarlos ya que varios de ellos son causales de faringitis especialmente los grupos B; C; G.

No está indicado realizar Gram en la investigación de faringitis.

Espustos exámenes directos de coloraciones

- Gram directo.
- Evaluar la flora bacteriana, número de leucocitos y células epiteliales así:
- En bajo aumento contar el número de células epiteliales por campo debe ser menor de 10, y leucocitos igual o mayor de 10.
- En aumento de 100 evaluar descriptivamente y enviar inmediatamente el resultado al médico.
- Realizar otras coloraciones para hongos y Micobacterias, si están indicadas.
- Al esputo se le realizaran las pruebas dependiendo de lo pedido por el clínico; lo que más frecuentemente se solicita es: baciloscopia, KOH y cultivo.

NOTAS: Las secreciones del tracto respiratorio inferior que se obtienen por aspirado transtraqueal percutánea, se deben realizar en pacientes hospitalizados,



comatosos, incapaces de recolectar muestras adecuadas. La muestra obtenida de esta forma previene la contaminación con la flora de la orofaringe.

Al cultivo de esputo se le hace una siembra de rutina y se incuba por 24 horas. Observar crecimientos de patógenos e identificarlos y realizar los antibiogramas correspondientes.

Si no se aíslan patógenos reportar la flora observada e informar que es flora normal.

VII. TALLER

- ¿Qué es la baciloscopia y cómo se informa?
- Elabore un informe de sus resultados y correlacione estos con los datos clínicos del paciente.

PRÁCTICA N°5 DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES DE OJOS, OÍDOS Y REGIÓN MASTOIDEA, POR EL LABORATORIO CLÍNICO.

I. INTRODUCCIÓN:

La otitis es la inflamación del oído que pueden presentarse con mayor frecuencia en la infancia. El origen etiológico puede ser viral, micótica o bacteriano, en algunos casos puede desencadenar en meningitis.

Es un quehacer del bacteriólogo la investigación de estas patologías.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Desarrollar habilidades en el procesamiento de los cultivos de las secreciones de los ojos, oídos y región mastoidea.

Objetivos específicos:



- Realizar cultivos de ojos, oídos y región mastoidea, en pacientes con patologías relacionadas, tratando de identificar y diferenciar la flora hospedera normal de los potenciales patógenos.
- Realizar pruebas de identificación y antibiogramas según se requiera en cada caso.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En el oído externo podemos encontrar una flora hospedera de la piel y además una flora natural del oído.

La infección bacteriana del oído puede comprometer el oído externo, medio. Un resfrío, una gripe, una infección de nariz o de garganta suelen proceder al surgimiento de esta patología causada por virus o bacterias. Los principales síntomas son un intenso y persistente dolor de oídos, debido a la inflamación del tímpano, y la pérdida temporal de la audición. Además, la secreción se puede infectar con bacterias provenientes de la nariz o la garganta". El tubo se abre al lado de las adenoides -ubicadas alrededor de las entradas de aire y comidas las que pueden complicar el cuadro de otitis, ya sea bloqueando las trompas (cuando son más grande de lo normal) o bien como fuente de infección (pues allí se concentran gérmenes).

Es importante tener en cuenta el Gram en el diagnóstico de las infecciones del oído para determinar si las bacterias que aislaron en forma predominante en el cultivo del oído son una flora transitoria, colonización o se es una infección: si se observa una flora predominante y reacción polimorfo nuclear se puede decir que es infección bacteriana, pero si no hay reacción leucocitaria no hay infección y lo que se aísla se puede considerar como colonización en tal caso no se realiza antibiograma.

OJOS: los ojos tienen una flora hospedera muy escasa ya que las secreciones conjuntivales contienen sustancias que no permiten el crecimiento de bacterias en condiciones normales. Cuando estas condiciones cambian o un verdadero patógeno llega al ojo se produce la conjuntivitis o queratitis según el caso.



Es importante realizar los cultivos y aislar el agente etológico para evitar la pérdida del ojo del paciente.

IV. MATERIALES Y REACTIVOS.

- Agar Sangre, EMB, Manitol, (agar azida con sangre), Sabouraud agar chocolate suplementado.
- - Colorantes de Gram, KOH con tinta azul Parker al 10 %, laminas, laminillas, mecheros, escobillones estériles, medios de transporte, asas bacteriológicas, pinzas, agar Chocolate, agar Sangre, agar Thayer Martin, escobillones estériles, Mueller Hinton, sensidiscos, medios para identificación bioquímica, Incubadora CO₂ ó Bomboneras para CO₂ (con vela o bicarbonato).

V. MUESTRAS:

- Secreciones de conjuntiva, cornea, oídos.

VI. PROCEDIMIENTO:

Conducto auditivo externo:

- Desinfectar la zona adyacente al conducto auditivo externo y tomar la muestra con un hisopo de algodón estéril, una muestra purulenta puede ser representativa para el aislamiento del agente causal. La muestra se coloca en un medio de transporte hasta su procesamiento.

Nota: El agente etológico en las otitis agudas pueden ser: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S aureus*, *Klebsiella pneumnoniae*. La tinción de Gram es significativa si se observa un solo tipo de microorganismo y abundantes PMN.

Ojos:

Tome muestra de cada ojo con diferentes hisopos previamente humedecidos con solución salina estéril, rotando el algodón por la superficie de la conjuntiva. Esto es



independiente de que solo un ojo esté infectado, ya que la muestra del ojo sano puede servir de control de la flora normal del paciente, y compararlo con el reporte del ojo infectado.

Nota: Secreciones conjuntivales o de córnea son muestras que se deben tomar con mucha precaución, el uso de aplicadores no está indicado, por la poca cantidad de muestra, la mayoría de las veces es necesario, aplicar anestésicos locales para tomar la muestra, que deben ser recolectadas de preferencia por el oftalmólogo.

OBSERVACIÓN: La Querato-conjuntivitis puede ser producida por virus, hongos, bacterias o *Actinomicetos*, las muestras deben ser tomadas con el borde de una lanceta o con asa bacteriológica.

La muestra debe ser procesada prontamente, se debe realizar:

- Examen directo (coloración de Gram y KOH).
- Cultivos.

Los medios en que se deben sembrar estas muestras son:

Estos medios deben ser incubados, en atmósfera de 5% de CO₂ durante 48 horas, para aislar microorganismos exigentes como *Haemophilus spp*, *Neisseria gonorrea*, *Corynebacterium sp*, *Streptococcus sp* que pueden involucrarse en estos procesos infecciosos. En caso de sospecharse de hongos se siembran por picadura, en medio de Saboureaou o Micosel. Las coloraciones directas con Gram suelen ser de mucha utilidad.

- A las 48 horas deben leerse los cultivos e investigar los diferentes tipos de colonias con coloraciones de Gram y pruebas específicas de diferenciación, así como antibiogramas en cada caso de ser necesario.

VII. TALLER



- Investiga ¿qué microorganismos afectan más frecuentemente el oído?
- Realizar un informe de sus resultados y compara estos con los datos clínicos de su paciente, anote sus observaciones al respecto. (Correlación clínica).

PRÁCTICAS N° 6 Y N°7 DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO GENITAL.

I. INTRODUCCIÓN:

Las infecciones del tracto genital se pueden clasificar en endógenas, las infecciones de transmisión sexual y las infecciones del tracto urinario, debido a que ambos tractos, genital y urinario, comparten varias porciones anatómicas, y las infecciones asociadas a desequilibrios en la flora genital.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Familiarizar al estudiante con las técnicas de diagnóstico de las infecciones genitales y de las vías urinarias.

Objetivos específicos.

- Tomar muestras vaginales para estudios microbiológicos.
- Realizar exámenes en fresco de secreciones vaginales y uretrales directos para el diagnóstico de vaginosis, vaginitis y uretritis.
- Realizar cultivos vaginales y uretrales.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El diagnóstico clínico etiológico de las infecciones genitales ya sea por flujo genital anormal, uretritis y de las úlceras genitales es una de las situaciones más difíciles



con que se enfrenta el bacteriólogo por las diversidades de etiologías y procedimientos que se deben realizar para llegar a un resultado confiable.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- *Espéculo estéril o desechable, guantes estériles, aplicadores estériles, agar Sangre, agar Thayer Martín, agar Chocolate, agar EMB, agar Manitol Salt, colorantes de Gram, solución salina, placas cubre objetos, placas porta objeto, KOH 10%, incubadora con CO₂, tiras para medir pH.*

V. MUESTRAS

Vaginales, Secreción de glándula de bartholino, cervicales, endo-cervicales uretral, semen.

PROCEDIMIENTO:

Secrecion de glándula de bartholino:

Limpie los genitales externos con agua y jabón y descarte el exceso de secreción.

Pus del absceso de la glándula puede ser colectado por palpación digital del ducto.

Solicite frotis y cultivo por Gonococos.

Aspire el líquido del ducto preferiblemente con aguja y jeringuilla.

Puede utilizar un sistema de transporte para anaerobios.

Cervical o Endo-cervical:

Visualice el cérvix utilizando un especulo sin lubricante. Limpie el excedente de secreción.

Remueva la mucosa y secreción del canal con un hisopo y descártelo.

Con un nuevo hisopo estéril de alginato de calcio, dacrón o algodón no tóxico, obtenga muestra del canal endo-cervical.



Preferiblemente inocule la muestra en un plato de Thayer-Martin y el resto envíelo al laboratorio.

Con otro hisopo colecciona muestra para colocarla en una placa para frotis.

Un cultivo anal puede ser colectado para acompañar la muestra cervical cuando se sospecha *N. gonorrhoeae*, ya que el recto podría ser el único sitio positivo.

Post-tratamiento.

No refrigere la muestra. Envíe pronto al laboratorio de microbiología.

VAGINAL: El cultivo rutinario de secreción vaginal no es apropiado debido a la presencia de alto número de microorganismos saprofitos en el área que hacen difícil la interpretación del cultivo.

Descarte el exceso de secreciones externas.

Obtenga la secreción de la mucosa vaginal con un palillo estéril no tóxico o con una pipeta.

Con otro palillo obtenga una muestra y colóquela en una placa para frotis directo. Esta placa puede servir también para confirmar vaginosis bacteriana, candidiasis vaginal o Trichomoniasis.

No se realiza cultivo por anaerobios.

SECRECIÓN URETRAL DAMA:

Colecte la muestra al menos 1 hora después que el paciente haya orinado.

Remueva el exudado del orificio uretral.

Colecte la descarga de material en un hisopo no tóxico por masaje de la uretra.

Si no hay descarga, lave la uretra externa con jabón y enjuague con agua. Inserte un hisopo 2 a 4 cm dentro de la uretra y rote el palillo.



Envíe la muestra rápidamente al laboratorio.

Secreción prostática:

Colecte la muestra al menos 1 hora después que el paciente haya orinado.

Limpie el meato urinario con jabón antiséptico y agua.

Proceda a masajear la próstata a través del recto.

Coleccione el fluido en un hisopo estéril y no tóxico o en un tubo estéril.

También es muy útil para recuperar gonococos el cultivo de orina después del masaje prostático.

Secreción uretral varones:

Colecte la muestra al menos 1 hora después que el paciente ha orinado.

Inserte un hisopo urogenital 2-4 cm dentro del lumen de la uretra.

Rote el hisopo.

Preferiblemente inocule directamente en un medio de Thayer-Martin.

Utilice otro hisopo para tomar muestra para el frotis directo.

La placa debe ser hecha en el sitio.

No refrigere la muestra.

Envíe rápidamente al laboratorio. Solicite antígenos por Chlamydia y cultivo por Micoplasmas.

No se realiza cultivos para anaerobios

Toma de la muestra:

- Introducir un espejuelo estéril o desechable, no lubricado en la vagina
- Medir el pH.



- Con Aplicadores estériles tomar muestras de exocervix y fondo de saco posterior.
- Hacer lamina para Gram, colorear y observar con objetivo de inmersión.
- Observar y cuantificar:

- Flora bacteriana.
- Reacción leucocitaria.
- Células epiteliales.
- Células guía.
- Levaduras y pseudomicelios.
- Presencia de células clave.
- Informar presencia o ausencia de flora de *Doderlein*.

Examen en fresco:

Colocar un aplicador con secreción en solución salina, poner una gota entre lámina y laminilla e informar:

- Células epiteliales por campo.
- Leucocitos por campo.
- Bacterias.
- *Trichomonas vaginales*.
- Ocasionalmente *Entamoebas*.
- Levadura.

Método para detectar olor aminas.

- Colocar sobre un portaobjeto una gota de la muestra del fresco.
- Agregar una gota de KOH al 10%
- Mezclar.
- Detectar si se presenta olor a pescado lo cual indica que la prueba es positiva.



- Si se presenta olor a pescado se informa: “olor aminas positivo”.

Cultivos:

Colocar el otro aplicador en medio de transporte, sembrar en los medios nombrados anteriormente e incubar el Thayer Martín y el chocolate en incubadora de CO₂ por 48 horas. Los otros medios incubarlos y revisarlos a las 24 horas. En el Thayer Martín investigar la presencia de: *Neisseria gonorrhoeae*. Realizar Gram y prueba de oxidasa a las que crezcan en este medio de cultivo.

En agar sangre investigar la beta hemolítica, realizar Gram y pruebas específicas según el caso. Investigar también la presencia de: *Lactobacilos*, *Staphylococcus*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus spp*, familia *Enterobacteriaceae*, y Levaduras. Para la identificación de cualquiera de estos gérmenes, se debe realizar antibiograma y pruebas confirmatorias cuando estén indicados.

Gardnerella vaginales

La *G. vaginales* es un microorganismo de crecimiento lento. Su mejor fase de crecimiento se da en una atmósfera de 3-6% de CO₂, a pesar de crecer sobre agar chocolate o agar sangre, no es fácilmente diferenciable de la flora coexistente abundante en secreciones vaginales. Por esta razón es necesario el uso de medios diferenciales, adicionados de antibióticos y sangre humana que inhiben el crecimiento de la flora no deseable. El microorganismo desarrolla colonias puntiformes beta hemolítica, que la diferencian de otros microorganismos.

Para investigar *G. vaginales* es necesario tener en cuenta:

- Examen directo de la muestra
- El pH varía de 6,0-6,5
- Prueba de aminas positiva (técnica explicada anteriormente)
- Las células claves o guías son células provenientes del epitelio vaginal, caracterizadas por estar invadidas por flora cocobacilar, Gram variable.



Eventualmente puede haber ausencia de célula clave; pero la gran cantidad de flora cocobacilar Gram. Negativa y Gram. Positiva con ausencia de flora de Doderlein y ausencia de reacción PMN puede ser indicativa de presencia de *Gardnerella vaginales* (ver, esquema de identificación número 1).

Otras Investigaciones.

- *Chlamydia trachomatis*, *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, *Micoplasmahominis*, y otros patógenos cuando se sospechan, se requieren manejos especiales.
- Pueden estar indicadas pruebas especiales para el diagnóstico de virus, como el Herpes virus 1 y 2 (virus del Herpes simple), Herpes virus tipo 5 (Citomegalovirus).
- Lesiones producidas por ectoparásitos como *Pthirus pubis* y *Sarcoptes scabiei*, se pueden sobre infectar con bacterias.
- Casos especiales como las secreciones post-quirúrgicas o abortos sépticos pueden requerir tomas de muestras especiales y búsqueda de gérmenes anaerobios.
- Uretritis No Gonocócica.

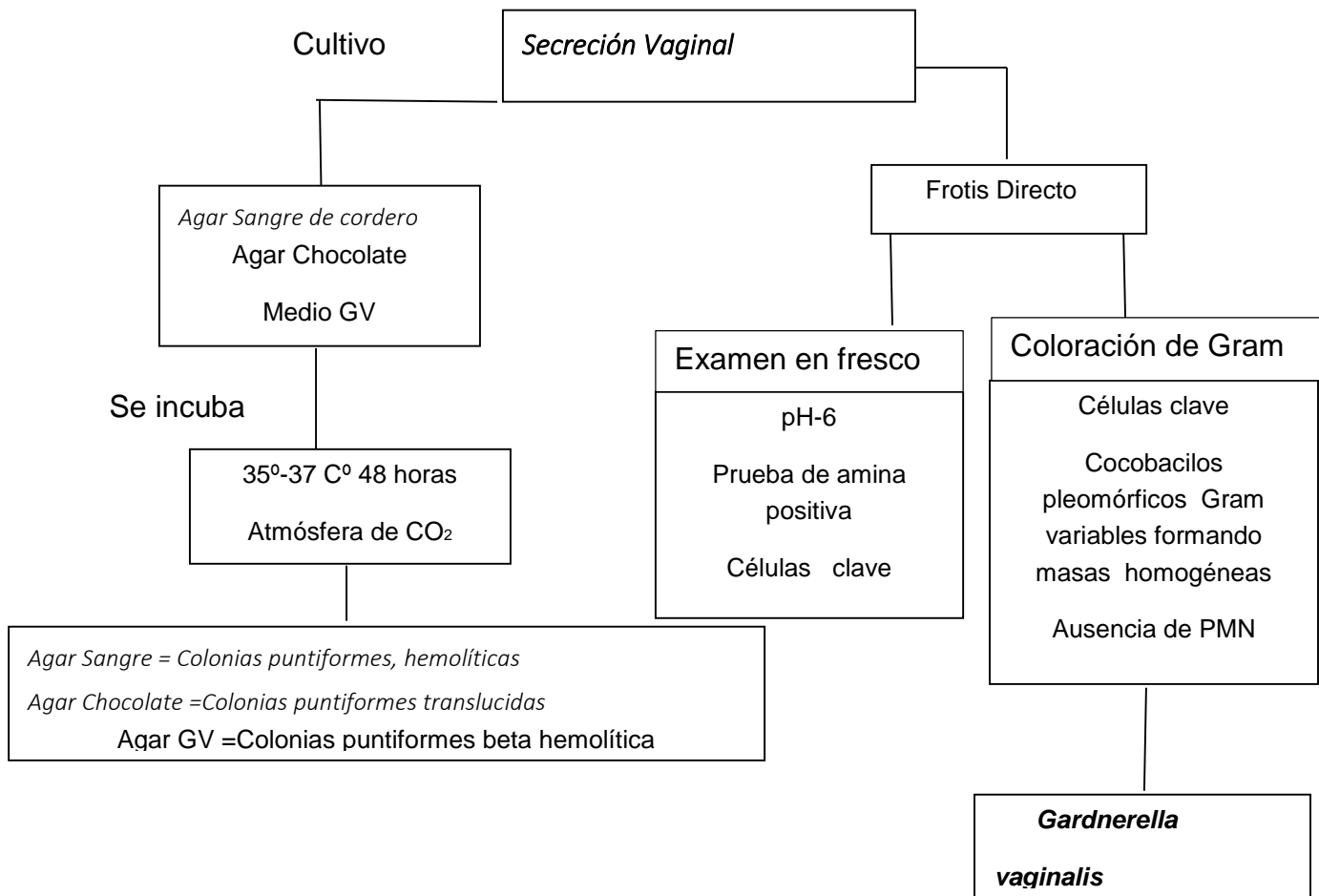
Microorganismos Implicados.

- *Gardnerella vaginal*.
- *Chlamydia trachomatis*.
- *Micoplasmahominis*.
- *Urea plasma urealyticum*.
- *Streptococcus grupo B*.



Esquema número 1

AISLAMIENTO GARDNERELLA VAGINALIS



VI. TALLER

Realice cuadro comparativo entre vaginosis y vaginitis

Teniendo en cuenta: agentes etiológicos, pH, Lactobacilos, células clave.



PRÁCTICA N°8 INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

I. INTRODUCCIÓN:

La infección de la orina, está provocada por la invasión de microorganismos en el tracto urinario. Puede producirse por dos vías diferentes: por el extremo inferior de las vías urinarias hombre o de una mujer, que es el caso más frecuente; o bien a través del flujo sanguíneo, en cuyo caso la infección afecta directamente a los riñones. Las infecciones de las vías urinarias más habituales son las producidas por bacterias, el diagnóstico de estas infecciones por el laboratorio clínico se hace realizando urocultivos

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Aprender los métodos de diagnóstico de las infecciones del tracto urinario.

Objetivos específicos

- Realizar urocultivos y recuentos de colonias.
- Identificar los parámetros que indican una infección del tracto urinario.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Normalmente la orina es estéril, pero en el proceso de recolecta espontánea se puede contaminar con flora genital. Por esto es muy importante dar una buena explicación para la debida toma de la muestra. Las infecciones del tracto urinario pueden localizarse desde el riñón hasta la uretra. Se presentan como infecciones simples cuando no se observan anomalías anatómicas o de otra clase.



Las infecciones del tracto urinario ocurren generalmente por vía ascendente desde la uretra, los principales agentes involucrados son: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, enterobacterias, *Pseudomonas*, entre otras.

Menos usual es la hematógena a partir de focos sépticos a distancia o infecciones generalizadas que pueden por esta vía afectar el tracto urinario siendo el *Staphylococcus mycobacterium tuberculosis* los microorganismos más involucrados.

- Recuentos superiores a 100 mil UFC por cc de un microorganismo único, se considera infección salvo algunas excepciones como cuando el microorganismo pertenece a la flora normal vaginal, en cuyo caso se considera la muestra mal tomada.
- En caso de recuentos superiores a 100 mil, realizar Gram y pruebas de identificación, e informar el recuento del microorganismo con su respectivo antibiograma.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Asas calibradas 0,01-0,001.
- agar cromo génico para orinas.
- Lamina porta objeto.
- Pipeta calibrada 10-50 landas.
- Mecheros.
- colorantes para Gram.

V. MUESTRAS: -Orinas

VI. PROCEDIMIENTO

- Lavar previamente los genitales con agua y jabón, desechar la primera porción de orina, recoger la parte media de la micción en un frasco estéril, guardar en la nevera si no va a ser procesada inmediatamente por un tiempo no mayor a 6 horas.



Orina por vaciado directo:

- Se recomienda recoger la primera orina de la mañana al despertar.
- Lave los genitales con jabón y abundante agua. Secar con un paño limpio.
- Dejar escapar la primera porción de orina y a continuación recoger la muestra directamente en un envase estéril.
- Enviar inmediatamente al laboratorio. Si no se puede, refrigerar la orina hasta por 2 horas.
- No utilizar orina de receptáculos.
- No utilizar orina de pool de 24 horas.
- No solicitar cultivo por anaerobios.
- El frotis directo por Gram de orina de mujeres recolectadas por vaciado directo, no es del todo confiable, ya puede estar contaminado por microorganismos de la flora normal vaginal.

Orina por cateterización:

- Limpie la porción del catéter donde se va a tomar la muestra de orina con alcohol etílico al 70 %.
- Inserte la aguja dentro del catéter y colecte la orina dentro de la jeringuilla.
- Transfiera la orina a un envase estéril.
- Enviar inmediatamente al laboratorio. En caso contrario refrigerar la orina.
- La colección de la orina por cateterización uretral tiene algún riesgo de forzar hacia la vejiga, parte de la flora normal uretral durante la inserción del catéter.
- Nunca recoja orina de la bolsa del catéter.
- No desconecte el catéter de su bolsa durante la colección de la muestra.
- Paciente con catéter por 48h – 72h pueden ser colonizados con múltiples cepas bacterianas.
- Indique en la orden médica si la orina ha sido colectada por catéter.

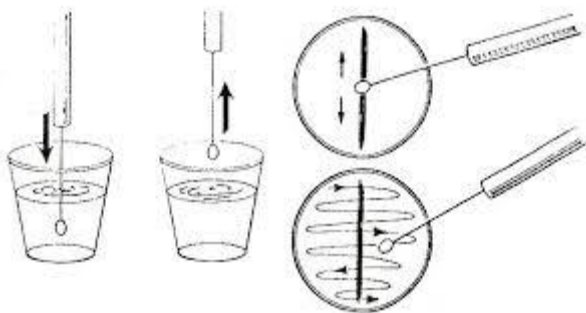
Orina por aspiración supra púbica:

- Mediante técnicas asépticas descontamine y anestesia el área de la punción.
- Introduzca la aguja calibre 22 dentro de la vejiga entre el pubis y el ombligo.
- aspire alrededor de 20 ml de la vejiga y transfiera la orina asépticamente a un envase estéril o tape la aguja y envíe la jeringuilla.
- Enviar inmediatamente al laboratorio, o refrigerar.
- Esta técnica evita la contaminación de la orina por microorganismos de la uretra o perianales.
- Es útil cuando se sospecha infección por anaerobios, en pacientes pediátricos si hay problema en la colección de la orina, pacientes con trauma en la médula espinal y en general en aquellos en que el método del vaciado directo o cateterización no ha sido posible.
- Sembrar con el asa calibrada por trapeado en medios de Sangre y EMB e incubar por 24 horas.

Otro método de siembra para recuento de colonias en orina es:

- Tomar un asa calibrada 0.001 ml.

Sembrar en agar cromo génico para hacer recuento.





Antibiogramas para Orinas:

Debe realizarse cuando el cultivo es puro y en todos los casos que se considere infección. Si el MO aislado es una Enterobacterias, entonces el antibiograma de primera línea puede incluir:

- Gentamicina, Cefalosporina de primera y segunda generación, Ampicilina /Sulbactan, - Trimetropin /Sulfa, Norfloxacin, Nitrofurantoina.

En casos de *Staphylococcus* en orinas:

- Ampicilina /Sulbactan, Ciprofloxacina, Oxacilina, Trimetropin /Sulfa, Vancomicina

Si se aíslan *Pseudomonas* el antibiograma de primera línea puede incluir:

- Gentamicina, Amikacina, Astreonam, Norfloxacin, Imipemen. Ceftazidime.

Nota: A niños en cualquier caso no incluir quinolonas y solo a niños mayores Trimetropinsulfa.

VII. TALLER

Investigue Tuberculosis renal y ¿cómo se realiza el diagnóstico por el Laboratorio de esta Entidad infecciosa?

PRÁCTICA N°9 Y N°10 DIAGNÓSTICO POR EL LABORATORIO DE LAS INFECCIONES GASTROINTESTINALES.

I. INTRODUCCIÓN:

Las infecciones gastrointestinales están dentro de las infecciones más comunes. A pesar que no siempre pueden ser severas y usualmente se resuelven rápidamente, pueden ser de seriedad en condiciones especiales de salud, especialmente en niños. Los microorganismos entero patógenos



afectan el sistema gastrointestinal y es responsabilidad del laboratorio la correcta identificación por medio del coprocultivo

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Conocer y practicar los métodos para el diagnóstico de entero patógenos.

Objetivos específicos

- Adquirir destrezas en la toma y conservación de muestra fecales para realizar investigación de entero patógenos.
- Procesar coprocultivos con los métodos tradicionales.
- Identificar entero patógenos.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El sistema gastro intestinal contiene una gran cantidad de microorganismos principal mente Entero bacteria y Enterococcus los cuales hacen parte dl normal funcionamiento de este órgano sin embargo algunos microorganismos llamados entero patógenos producen graves infecciones gastro intestinales, el coprocultivo es el método de aislamiento e identificación para estas patologías, Los medios de SS; Selenito, XLD son los más usados por sus características que sirven para este tipo de investigación.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Tubos tapa rosca con caldo de Selenito.
- Buffer glicerinado pH 7.
- Medios de SS, EMB, MAC CONKEY, XLD.
- Tubos con sol salina estéril.

V. PROCEDIMIENTO:

La recolección y preservación de heces es dispendiosa pero necesaria, para el aislamiento de micro-organismos causantes de procesos infecciosos gastro-intestinales, para este proceso se debe:



- Recolectar en recipiente estéril.
- Los medios de transporte son necesarios, únicamente cuando se va a sembrar después de 2 horas de recogida.
- Si no va a ser procesada el mismo día, debe utilizarse una solución preservadora que consiste, en una solución tamponada de fosfatos 0,033 molar, mezclada con glicerol a partes iguales, el pH de la solución debe ser aproximadamente de 7,1.
- A una cantidad aproximada de 20-30 ml de solución preservadora, agregar 0,5-2 gms de materia fecal, se homogeniza en frascos estériles tapa rosca. En esta forma se puede conservar la muestra por 30 días.

Medios de transporte recomendados:

- Buffer glicerinado pH 7 es excelente para *Shigella*, bueno para *Salmonella*, no útil para *Campylobacter* ni virus.
- Cary Blair: Bueno para *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, regular para *Shigella*.

Pasos para la siembra y procesamiento:

- Tomar la muestra con un escobillón y sembrar en los respectivos medios de cultivo.
- Tomar un gramo de materia fecal y colocarlo en caldo de Selenito e incubar por 12-18 horas.
- En todos los medios, se buscan las colonias lactosa negativa y se identifican, mediante reacciones bioquímicas.
- La recuperación de patógenos es más alta cuando se trabajan los medios sembrados a partir del caldo de enriquecimiento.



Consideraciones:

- Se considera a *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Campylobacter* como patógenos intestinales.
- *E coli* tiene muchas variables desde cepas que forman parte de la flora normal hasta *E coli* productoras de diarreas como enteró - hemorrágicos, entero-toxigénico, entero-invasivos.
- *Vibrio*, *Aeromonas*, y *Plesiomonas* son patógenos en casos determinados y su identificación, debe ser solicitada por el médico de acuerdo a la sintomatología y condiciones del paciente.
- El *Staphylococcus aureus*, puede estar implicado en procesos infecciosos del aparato gastrointestinal y también en intoxicación alimenticia por cepas productoras de toxinas. Estas toxinas son termoestables y por ello puede no encontrarse el germen en estos casos.
- Algunos *Clostridium* pueden producir enterocolitis Seudomenbranosa producida por el *Clostridium difficile* o la intoxicación por la toxina del *Clostridium perfringens*.
- Existen gérmenes oportunistas, que, en pacientes con daños severos del sistema inmunológico, pueden causar condiciones que requieren estudios adicionales de materia fecal.
- Los microorganismos pertenecientes al género *Campylobacter* en sus especies *jejuni*, *coli*, *fetus* son patógenos potenciales, que pueden producir cuadros diarreicos y septicemias en el hombre.
- El éxito que puede tenerse en el aislamiento de *Campylobacter* depende de 3 factores esenciales:
 - El uso de medio selectivo para aislamiento primario.
 - La incubación de los medios de cultivo en una atmósfera específica.
 - La incubación de los medios primarios a 42 °C.



ANTIBIOGRAMA

- El antibiograma de primera línea sería:
- Ampicilina, Cloranfenicol, Cefotaxime, Trimetropinsulfa. Quinolonas.

Investigación de infección por *Campylobacter spp* Los microorganismos del genero *Campylobacter* son microaerofilicos y el uso de factores selectivos para su aislamiento, asegura una buena recuperación del microorganismo en muestras de materia fecal e hisopados rectales, las cuales deben ser cultivados de rutina, para descartar la presencia de microorganismo de este género especialmente la especie jejuni, que es el agente probable causal de diarreas más frecuentes.

El *C. fetus* es una de las especies frecuentemente relacionadas con infecciones extra intestinales como septicemias. El aislamiento de este microorganismo a partir de sangre y otros líquidos orgánicos no representan el mismo problema que cuando es aislados de materia fecal, debido a que puede aislarse a partir de AS de cordero y a partir de hemocultivos procesados en agar Tripticasa Soya Caldo o Infusión Cerebro Corazón, que deben ser incubados a 42°C en atmósfera de CO₂.

NOTA: La presencia de sangre y leucocitos en materia fecal de personas infectadas por *C. jejuni* indican que este microorganismo puede ser invasivo.

- Las muestras deben ser sembradas directamente, sobre los medios de cultivo selectivos dentro de las 2 horas siguientes a su recolección, no se deben conservar en medio de Cary-Blair (transporte).
- Los medios selectivos de Skirrow, Butzier y Campy BAP (agar Plate), se inoculan con los hisopados rectales o con una suspensión de materia fecal en caldo de cultivo (0,5gms de materia fecal en 3-5 ml de caldo Brucella o caldo Cerebro Corazón). Se inoculan 2-3 gotas sobre una cuarta parte de la caja extendiendo luego la muestra con asa, para obtener colonias aisladas. Las cajas se incuban a 42 °C por 48 horas a una atmósfera específica (5%

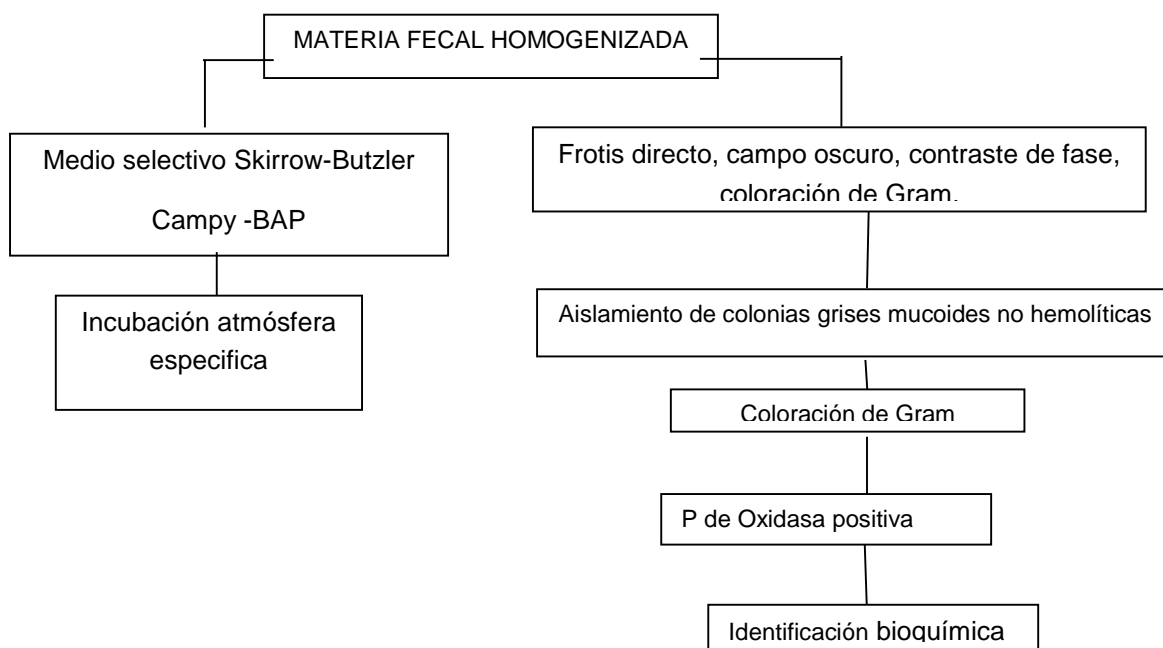
de O₂ , 10 % de CO₂ y 85% de N₂).El *Campylobacter* puede crecer entre 36 y 42°C, la excesiva temperatura inhibe el crecimiento de otros entéricos que pueden resistir la concentración de antibióticos del medio, permitiendo el crecimiento de las especies de *Campylobacter*.

- Un tiempo de 48 horas de incubación como mínimo, deberá permitir el crecimiento de colonias no hemolíticas, de color gris y consistencia mucóide. Una coloración de Gram de estas colonias sospechosas, dejará ver la morfología característica de bacilos Gram negativos en espiral. Son Oxidasa y Catalasa positivos, la identificación de la especie, se hace con pruebas bioquímicas y el crecimiento presentado a diferentes temperaturas.

La prueba de Catalasa clasifica las diferentes especies de *Campylobacter* en dos grupos:

- Catalasa positiva (son los que tienen relación con infecciones humanas).
- Catalasa negativa.

Esquema número 2 dentificación del *Campylobacter*





VI. TALLER

- Elabore un informe de sus resultados y correlacione estos con los datos clínicos del paciente.
- Investigue: ¿Qué otro tipo de microorganismos afectan el sistema gastrointestinal y cómo se realiza el diagnóstico en el laboratorio de microbiología?

PRÁCTICA N°11 ESTUDIO DE ABSCESOS HERIDAS MORDEDURAS: INVESTIGACIÓN DE ANAEROBIOS.

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos anaerobios por lo general hacen parte de la microbiota de las mucosas del cuerpo, pero cuando accidentalmente ingresa a sitios estériles del cuerpo producen abscesos de difícil manejo. La realización de cultivos para investigar anaerobios es de gran ayuda al clínico.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Realizar cultivos de microorganismos anaerobios y conocer las patologías que ellos producen.

objetivo específico:

- Conocer los procedimientos específicos que se realizan en investigación de microorganismos anaerobios.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS



Las muestras para investigación de microorganismos anaerobios deben ser tomadas por punción e impedir que la muestra entre en contacto con el O₂. Las muestras deben ser procesadas inmediatamente llegue al laboratorio. Antes de sembrar la muestra deben prerreducirse los medios líquidos: Para esto se colocan por 10 minutos en baño de agua hirviendo y luego se enfrían bajo chorro de agua fría, con el objeto de desalojar el O₂ que pueda encontrarse en el tubo.

Los medios deben permanecer de 1 –2 horas en ambiente anaerobio o por 12 horas en ambiente de CO₂ antes de ser sembrados. El uso de medios selectivos como Kanamicina-Vancomicina, agar FenilEtil-Alcohol y agar Yema de Huevo es necesario, porque las muestras de abscesos y heridas infectadas, presentan generalmente flora mixta de microorganismos aeróbicos y anaeróbicos.

- El agar Fenil-Etil-Alcohol soporta el crecimiento de la mayoría de anaerobios Gram-positivo, inhibiendo microorganismo de la familia *Enterobacteriaceae* y de bacilos Gram-negativos anaerobios facultativos. El agar Sangre con Kanamicina-Vancomicina permite aislar anaerobios estrictos Gram-negativos como *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Veillonellay* *Acidaminococcus*, inhibiendo el crecimiento de otra clase de microorganismos aerobios y de anaerobios Gram-positivos.

NOTA: El agar Yema de Huevo con Noemicitina puede ser útil para el aislamiento de *Clostridium* sp, de muestras con flora poli microbiana. La producción de lectinasa o lipasa que puede observarse en este medio, son útiles como características diferenciales de este género.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS:

- Agar Tripticasa Soya con 5% de sangre de cordero y adicionado con hemina, vitamina, vitamina K1, extracto de levadura y L cistina.
- Agar sangre adicionado con Kanamicina –Vancomicina



- Agar Fenil- Etil-Alcohol adicionado con 5% de sangre de cordero.
- Agar Yema de Huevo con Neomicina.
- Caldo Tioglicolato sin indicador o el caldo glucosa con carne con vitamina K y hemina son los más indicados.

La tabla N° 3 resume los medios de cultivo que puede utilizarse para el aislamiento de bacterias anaerobias estrictas.

TABLA N° 3. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE AEROBIOS.

Medios De Cultivo Para Aislamiento De Anaerobios	
Medios de cultivo	Aislamiento
Agar Tripticasa de Soya adicionado al 5% de sangre de cordero, hemina, L-cistina, vit K, y extracto de levadura.	Aislamiento de bacterias Anaerobias microaerofilicas, y aerobias.
Agar Fenil –Etil-Alcohol, adicionado al 5% de sangre de cordero.	Medio selectivo para el aislamiento de bacterias Gram positivas anaerobias estrictas. Inhibe el crecimiento de <i>Enterobacterias</i> , de bacterias micraerofilicas y MO anaerobios facultativos.
Agar con Kanamicina-Vancomicina.	Medio selectivo para aislamiento de bacilos Gram negativos anaerobios estrictos y <i>Veillonellaspp</i>



Agar Yema de Huevo {suplementado con Neomicina}.	Medio diferencial para el aislamiento de <i>Clostridium</i> y otros anaerobios Gram positivos y Gram negativos.
Thioglicolato o Caldo Glucosa con carne {suplementado con vitamina K y Hemina}.	Medios de enriquecimiento usados como suplemento de los medios. Útiles para el aislamiento de Actinomyces spp.

V. MUESTRAS:

Aspirados de abscesos de cualquier órgano que este afectado pus extraído en forma estéril.

VI. PROCEDIMIENTO:

Para Inoculación Primaria (**ver esquema N° 3**): Las muestras líquidas deben ser sembradas, con pipetas capilares estériles. Los tubos con medios líquidos, deben inocularse con 2-3 gotas de la muestra en el fondo del tubo y las cajas de agar, con una gota de la muestra, luego se hace método de agotamiento para obtener colonias aisladas.

- Las muestras de tejido, deben cortarse en pedazos muy pequeños con un bisturí estéril. Se agrega 1-2 ml de Thioglicolato y se homogeniza en un mortero estéril, para inocular luego en los agares.
- Las muestras tomadas con escobillón, deben ser sembradas en agar y en medio líquido. Si solo se recibe un hisopo, este debe colocarse en caldo de Thioglicolato e incubarse como si se tratara de muestra líquida.
- Preparar frotis para Gram con una gota de la muestra colorear y leer.

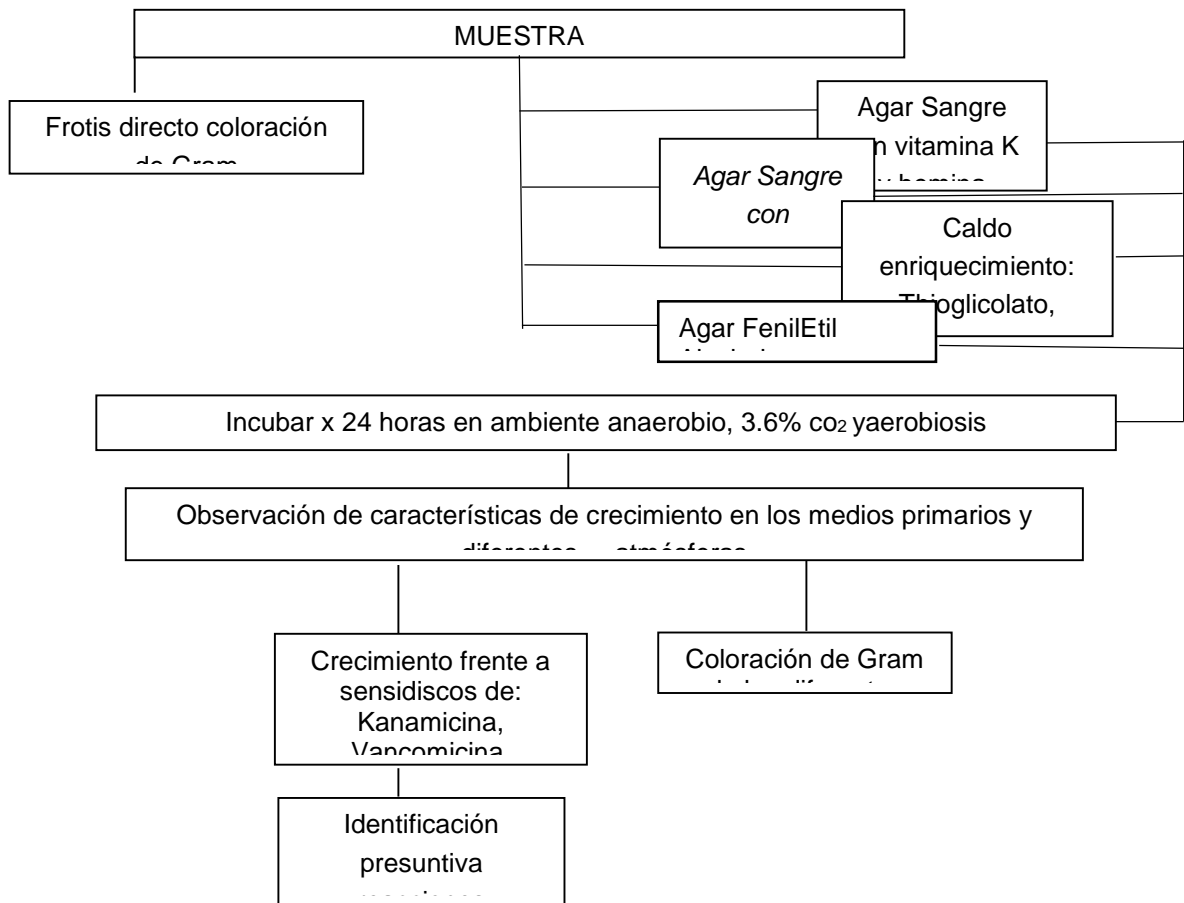
OBSERVACIÓN: La observación inicial de los cultivos, es uno de los pasos más importantes para el aislamiento de microorganismos anaerobios.



Se debe examinar muy bien el crecimiento, en condiciones anaerobias y luego hacer sub-cultivos de las colonias obtenidas, colocando rápidamente las cajas de cultivo en condiciones anaerobias, para evitar pérdida de microorganismos muy sensibles al oxígeno. Hacer también sub-cultivo en atmósfera de CO₂ y aerobiosis e incubar por 48 horas.

La apariencia de las colonias sobre el agar sangre anaeróbico, la coloración de Gram y las características macroscópicas y microscópicas de las colonias aisladas pueden ser útiles en una identificación presuntiva.

Esquema N° 3 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS ANAERÓBIOS





VII. TALLER

- Elabore un informe de sus resultados y correlacione estos con los datos clínicos del paciente.

PRÁCTICAS N°12 ESTUDIO DE LÍQUIDOS CORPORALES

I. INTRODUCCIÓN

Los diferentes líquidos que hacen parte del cuerpo humano son estériles el ingreso de cualquier microorganismo a estos sitios produce patologías infecciosas que pueden llegar a ser fatales. Para estos casos es de vital importancia realizar el cultivo para determinar la causa y poder realizar tratamiento adecuado.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Aprender los procesos que se realizan a muestras de LCR o cualquier otro tipo de líquido corporal cuando llegan al laboratorio de Microbiología para estudio.

Objetivos específicos:

- Realizar cultivos de LCR, Sinoviales, Pericardios, Ascíticos, con sus respectivos procedimientos.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

LÍQUIDOS CORPORALES

Examen microbiológico de: LCR, líquido articular, líquido ascítico, líquido amniótico.



LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El examen de LCR se realiza en pacientes sospechosos de tener un proceso infeccioso del SNC, representa uno de los más importantes procedimientos de urgencia, que debe realizar el laboratorio de microbiología clínica, debido a la necesidad, de administrar una terapia antimicrobiana apropiada, cuando se identifica el verdadero agente etiológico y reducir las complicaciones, que pueden ser fatales.

IV. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

-Agar Chocolate suplementado, agar Sangre, agar EMB, caldo Nutritivo, tubos estériles, pipetas o capilares estériles, estufas con CO₂, mecheros y asas.

V. **MUESTRAS:** Líquidos corporales (LCR, L; pleural, L. peritoneal).

VI. PROCEDIMIENTO:

La punción lumbar, es el método de elección para el diagnóstico de las infecciones del SNC; esta debe ser realizada por personas competentes y bajo estrictas condiciones de asepsia, para evitar contaminación de la muestra.

El líquido, debe ser recolectado en frascos estériles con tapa rosca y no deben utilizarse tubos con tapa de algodón o caucho y debe ser enviado al laboratorio, lo más pronto posible. Al llegar al laboratorio se observa el aspecto del líquido y se informa así:

- Cristal roca (Si el líquido es totalmente cristalino).
- Xantocrómico transparente (Si tiene un color amarillo, pero no presenta turbidez)
- Turbio (si se observan floculaciones).
- Hemático (si presenta sangre).
- Al pie del mechero, se separa una porción de líquido en un tubo estéril, se tapa muy bien y se centrifuga por 15 minutos a 10000 RPM para concentrar los microorganismos presentes. Algunos microorganismos como el *H influenzae*



necesitan, hasta de 15 minutos de tiempo de centrifugación cuando están escasos.

- Al terminar la centrifugación, se decanta el sobrenadante, se mezcla bien el sedimento y se realiza: Gram, Ziehl Neelsen, tinta China, KOH.
- Se siembra colocando con una pipeta o capilar estéril una gota del sedimento, sobre cada uno de los medios y tres gotas en el medio líquido, se hace agotamiento y se incuban en CO₂ por 24 horas.

Las preparaciones directas de líquidos coloreadas con Gram, ZiehlNeelsen, deben ser observadas cuidadosamente, tratando de cubrir un buen número de campos microscópicos.

Nota: La respuesta inflamatoria puede ser de ayuda en el diagnóstico de las meningitis, la respuesta de PMN generalmente se observa en meningitis bacteriana, a excepción de la meningitis tuberculosa o por *Leptospira*, en la que se observa predominio de linfocitos.

En la meningitis viral las respuestas leucocitarias predominan los linfocitos.

En la meningitis micótica, se observa predominio de linfocitos.

En la meningitis producida por *Leptospira* o por protozoos es de linfocitos.

Informe

El informe de los resultados debe incluir:

- Gram, si es positivo se informan descriptivamente los gérmenes y se incluyen los leucocitos.
- Si es negativo se informa “no se observan gérmenes”.
- Cultivo, Si es negativo se informa: “No se obtuvo crecimiento bacteriano en 72 horas de incubación”. Si es positivo se informa el microorganismo aislado y su



respectivo antibiograma de acuerdo al siguiente esquema:

Neisseria meningitidis

En primera línea se puede incluir:

- Ampicilina, - Rifampicina, - Cloranfenicol, - Amino glucósido, - Ciprofloxacina.

Haemophilus influenzae

- Ampicilina, - Cloranfenicol, AmpicilinaSulbactan, Trimetropinsulfa, Amino glucósido.

- Ciprofloxacina.

Listeria spp

- Ampicilina, - Tetraciclina, - Trimetropinsulfa, - Ciprofloxacina.

Enterobacterias

- Azactan, - Aminoglucósido, - Cloranfenicol, - Trimetropinsulfa, - Ciprofloxacina.

Staphylococcus

- Vancomicina, - Ampicilina, - Aminoglucósido, - Oxacilina, - Ciprofloxacina.

Streptococcus Pneumoniae

- Penicilina, - Oxacilina, - Ampicilina, - Dicloxacilina.

Además de los exámenes ya enumerados a los LCR se le realiza a solicitud del médico los siguientes exámenes:

- Prueba de látex para la determinación de antígenos bacterianos.

- Cultivo para *Mycobacterium*.

- Cultivo para hongos.

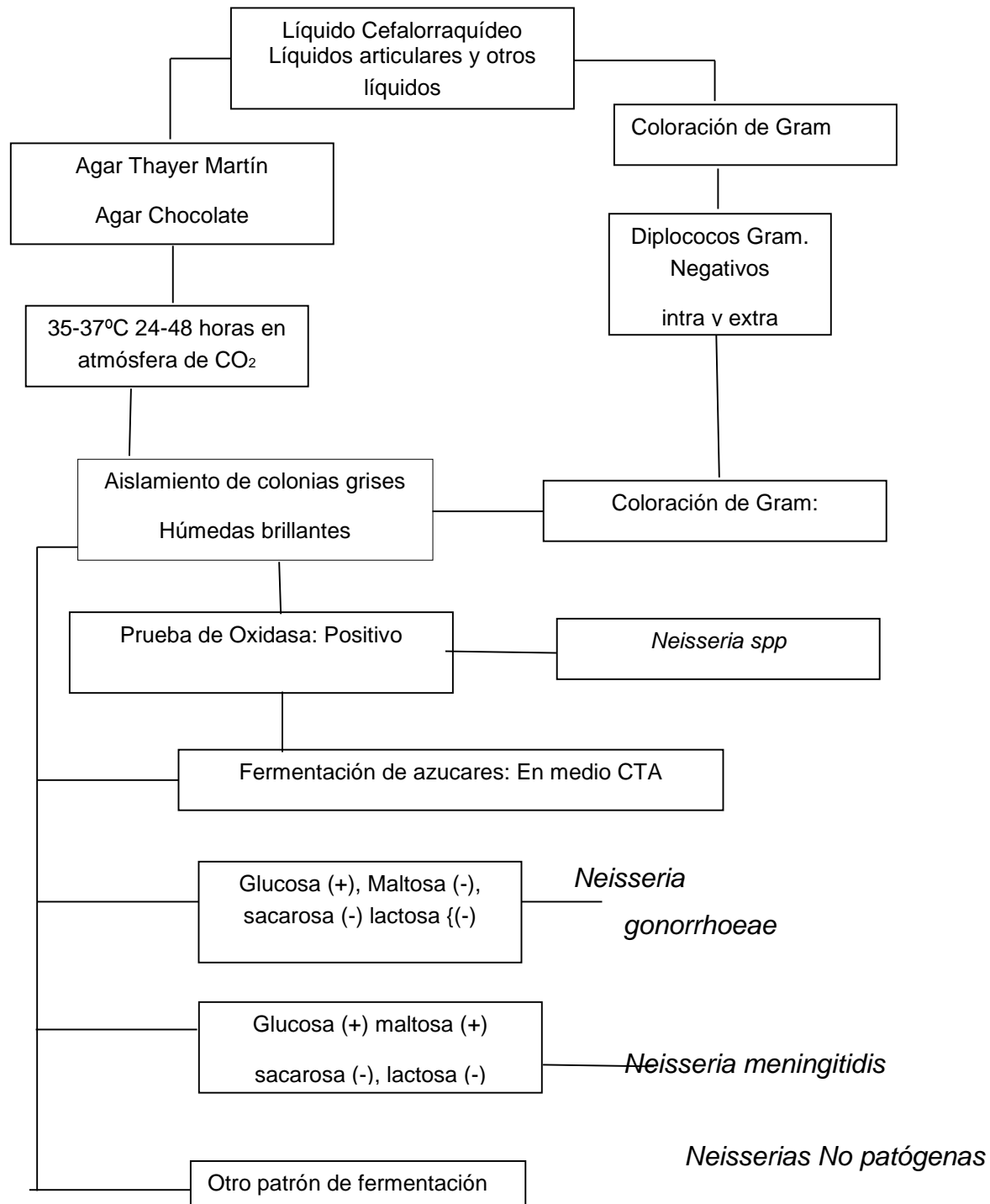
- Elisa para TB.

- Elisa para Cisticercos.



El esquema de identificación número 4 es una guía para el procesamiento de muestras para el aislamiento e identificación de microorganismos del género *Neisseria*.

Esquema número 4





- Frecuencia de gérmenes:

Enterobacterias.

Streptococcus.

Enterococos.

Neisseria gonorrhoeae.

Chlamydias.

Anaerobios {*Bacteroides*, *Peptococcus*, *Clostridium*}.

VII. Taller de actividades: investigue los principales microorganismos que afectan las meninges.

PRÁCTICA N°13 HEMOCULTIVOS Y MIELOCULTIVOS

I. INTRODUCCIÓN

La infección sistémica es un término genérico que se utiliza para nombrar a las infecciones causadas por microorganismos que involucran el sistema circulatorio, En el caso de los humanos, la diseminación parte sobre todo de piel o mucosas donde pasa a circulación y de ahí a órganos pertenecientes a los diferentes aparatos y sistemas , el hemocultivo en este caso es un método de identificar el agente causal.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Conocer los métodos de recolección y procesamiento de muestras para el diagnóstico de bacteriemias, septicemias, endocarditis bacterianas etc.

Objetivo específico

- Tomar y procesar hemocultivos.
- Reconocer a través de los aspectos de los hemocultivos la posible presencia de microorganismos.



- Identificar todos los cuidados y precauciones que se deben tener en el procedimiento de esta muestra para la obtención de resultados correctos y confiables.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Probablemente el espécimen más importante que llega al laboratorio de microbiología para su análisis es la sangre destinada al cultivo.

La presencia de microorganismos vivos en la sangre del paciente refleja, casi siempre una infección activa y posiblemente diseminada en los tejidos.

El pronto y seguro aislamiento e identificación de microorganismos presentes en un proceso de septicemia es una de las funciones más importantes del laboratorio clínico.

Las bacteriemias son continuas en endocarditis, fiebre tifoidea, brucelosis y usualmente inminente en otras infecciones.

En cuadros donde se sospecha una endocarditis bacteriana deben tomarse 3 hemocultivos separadamente y en un intervalo que no supere las 24 horas.

En bacteriemias intermitentes como las que se pueden presentar en cuadros de infección urinaria, gastrointestinal, o epiglotis, 3 muestras de sangre colectadas en un período de 24 a 48 horas son usualmente suficientes para aislar el agente causal.

Si el paciente ha recibido antibióticos antes de la colección de la muestra debe tomarse un total de 4-5 muestras separadamente en un tiempo no mayor a 48 horas.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Frascos para Hemocultivos, jeringas estériles, Algodón, jabón quirúrgico, yodo, alcohol, medios de cultivo: Agar Sangre, agar Chocolate suplementado, agar EMB.

V. MUESTRAS:

Sangre extraída en forma estéril en frascos para hemocultivos.



VI. PROCEDIMIENTO

- Las condiciones de toma de muestras de sangre, deben ser asépticas limpiando primero la zona de la piel con agua y jabón quirúrgico, luego se aplica yodo al 2% y con un algodón con alcohol de 80-95 % terminamos la limpieza. Todo el procedimiento se hace en forma concéntrica, del centro hacia fuera. El yodo debe permanecer por lo menos un minuto en la piel para una correcta desinfección. El sitio desinfectado no debe ser tocado con los dedos, a menos que hayan sido desinfectados previamente.
- Se recomienda recolectar de 5-10 ml de sangre en cada toma, pues un volumen menor, reduce el porcentaje de recuperación de microorganismos. En neonatos y niños menores de 6 años la toma de 1-5 ml de sangre puede resultar satisfactoria y debe ser recogida en frascos especiales (pediátricos).
- Una cantidad óptima de sangre en el cultivo, puede relacionarse en proporción del 10 % de sangre por cantidad de medio de cultivo: para 50 ml de medio 5 ml de sangre son suficientes, con el fin de reducir la actividad normal bactericida de los mediadores químicos y celulares de la inmunidad.
- Los medios de cultivo que pueden obtenerse comercialmente son: Caldo de Tripticasa Soya, Columbia, Caldo de Infusión Cerebro Corazón o el tradicional medio de Ruiz –Castañeda, que son satisfactorios cuando son envasados bajo condiciones de vacío, con atmósfera de CO₂ y con un contenido adecuado de SPS (Sulfonato Sódico de Polianeto) como anticoagulante, con actividad anti-fagocítica y anti-complementaria y sacarosa.
- Deben tomarse diferentes botellas de hemocultivos que provean las diferentes atmósferas necesarias según los requerimientos de cada microorganismo puedan encontrarse produciendo una bacteriemia. Una vez



tomadas las muestras los hemocultivos deben ser incubados de 35-36 °C, deben ser examinados diariamente hasta el séptimo día para evidenciar crecimiento. La mayoría de los MO son recuperados en este periodo de tiempo, sin embargo, puede ser necesario periodos más prolongados en pacientes sometidos a antibioterapia y en entidades como la endocarditis causada por microorganismos de crecimiento lento y exigente.

- Inmediatamente se visualice turbidez o hemólisis o formación de coagulo en el frasco de hemocultivo se realiza sub. -cultivos y Gram y se reporta inmediatamente el resultado. Si pasadas 48 horas el frasco no presenta ningún cambio de todas formas se le realiza sub. -cultivo y Gram y si no se observa crecimiento en estos se envían informes preliminares.
- Ciertos microorganismos como Brucellas se pueden aislar mejor cuando se inocula el medio de doble fase de Ruiz- Castañeda incubándolo hasta por 4 semanas con sub. -cultivos máximo 2 veces por semana sobre medios de agar Brucella o agar Suero Dextrosa con antibióticos para recuperar el microorganismo.
- Este medio difásico también es útil en la recuperación de Neisserias patógenas presentes en la sangre. Al recuperar el microorganismo de la sangre se identifica y se procede a realizar el antibiograma.

PRÁCTICA N°14 CONTROL DE CALIDAD

I. INTRODUCCIÓN:

El control de calidad en el laboratorio es una rutina que garantiza la confiabilidad de los resultados que aquí se emiten.



II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Analizar los factores que representan un riesgo para el correcto funcionamiento del laboratorio de microbiología.

Objetivo específico

- Realizar controles necesarios, para el mantenimiento de las normas de bioseguridad.

III. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Son muchas las circunstancias, que pueden contribuir a alterar los resultados de un laboratorio de análisis clínico. Las causas involuntarias generalmente conducen a pequeños errores, pero en ocasiones, pueden alterar de tal manera los resultados, que sus consecuencias afectan adversamente al paciente, que en última instancia es a quien van dirigidos.

La responsabilidad del profesional para asegurar la calidad en su trabajo, va más allá de la exactitud y la perfección con que pueda analizar y reportar, el contenido de una muestra. Esta responsabilidad, debe incluir un buen criterio para determinar cuándo se realiza una apropiada toma y transporte de la muestra, utilizando métodos estandarizados, que aseguren un buen procesamiento de la misma.

Materiales y Reactivos

IV. MUESTRAS:



V. PROCEDIMIENTO

- Medios De Cultivo y Cultivos Patrones.

Las siguientes recomendaciones se deben tener en cuenta con los medios de cultivo, los reactivos y las cepas patrones utilizadas en Bacteriología.

- Medios de cultivo:

- Marcar con fecha cada frasco deshidratado cuando se comience a usar. Guardar los medios deshidratados en frascos bien cerrados a temperatura de 25 °C o guardar en el refrigerador; descartar los medios cuando se observe decoloración o hidratación.
- Usar medios deshidratados siempre que sea posible, debido que un lote de medio que ha sido probado con anterioridad, es más probable que de mejores resultados que un medio que ha sido preparado a partir de ingredientes frescos, por ejemplo, es más seguro que con Agar BordetGengou, obtenido comercialmente se tienen mejores resultados que si el medio es preparado a partir de infusión fresca de patatas.
- Se deben seguir las instrucciones de peso y medida para la preparación de cada medio.
- Mezclar suficientemente hasta obtener una solución homogénea, antes de esterilizar o dispensar evitando la formación de burbujas, no sobrecalentar, limitar el calentamiento al nivel necesario para obtener la disolución completa.
- Abrir el autoclave inmediatamente después que el ciclo de esterilización ha finalizado. Evitar una prolongada conservación en baño de agua antes o después de esterilizar.
- Si se prepara medio de agar Sangre, agregar la sangre a la base cuando esta tenga de 45-50 °C. Para agar Chocolate agregar la sangre al agar base a 80-85 °C, mezclar evitando burbujas antes de dispensar.



- Determinar el pH final de cada lote del medio ya preparado, antes de medir el pH se debe enfriar el medio a TA.
- Dispensar el medio en condiciones estériles, en cámara de flujo laminar; poner a funcionar el aire estéril de la cámara por lo menos 30 minutos antes de comenzar a dispensar.
- Siempre deben dispensarse los medios sobre una superficie perfectamente limpia.
- Lavar perfectamente las manos antes de servir los medios.
- No permita que personas de otras áreas entren al cuarto o zona estéril cuando se están dispensando los medios.

CONTROL DE ESTERILIZACIÓN

Pruebas de esterilidad de los componentes de algunos medios:

- Determinar la esterilidad de la sangre por lo menos 48 horas antes de usarla guardar la sangre refrigerada y descartarla si observa hemólisis o contaminación.
- Incubar por lo menos una caja por cada lote durante 48 horas antes de usarla.
- Probar la esterilidad de algunos aditivos que deben agregarse al medio base antes de usarse.

Control de calidad que se le debe realizar a los medios de cultivo de uso en Bacteriología:

Cultivos de referencia

- Mantener un lote de cultivos de microorganismos conocidos para probar los medios de cultivo, colorantes y algunas reacciones de identificación bacteriana.



- Probar cada medio de cultivo antes de usar inoculando los medios con cultivo puros de especies conocidas que tengan características de crecimiento positivo y negativo para los medios que se están probando.
- Cada laboratorio debe establecer sus propios cultivos positivos y negativos para cada medio.
- Todos los medios diferenciales deben ser probados para su habilidad de soportar las características de crecimiento de los microorganismos que se deben aislar y la inhibición de bacilos o cocos, por ejemplo, el medio EMB debe mostrar buen crecimiento de bacilos Gram negativos, pero debe inhibir la mayoría de los de las bacterias Gram positivas.

- Control de calidad de los colorantes.

Se debe probar cada uno de los colorantes cuando se preparan y repetir este proceso semanalmente. El colorante de ZiehlNeelsen debe ser chequeado todos los días. Muchos errores en el proceso de coloración pueden ocurrir cuando las preparaciones son excesivamente delgadas o gruesas.

En la tabla N° 4 se encuentran las bacterias aeróbicas utilizadas como controles en varios medios de cultivo en placa.

Medios en Placa	Organismos control	Resultados esperados
Agar EMB	<i>E coli</i>	Colonias metálicas
	<i>Shigella flexneri</i>	Colonias incolora
Feniletil Alcohol Agar	<i>S. aureus</i> <i>E coli</i>	Crecimiento <i>No crece</i>



Agar Chocolate	<i>H. influenzae</i>	Crecimiento
Agar McConkey	<i>E coli</i> <i>Shigella flexneri</i> Staphylococcus	Colonias rojas Colonias incoloras No crece
agar SS	<i>Salmonella enteritidis.</i> <i>Staphylococcus</i>	Colonias incoloras No crecimiento

TABLA N° 4. BACTERIAS AEROBIAS EMPLEADAS COMO CONTROL.

Agar Thayer Martin	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Crecimiento
	Neisseria meningitidis	<i>Crecimiento</i>
	Moraxella catarrhalis	<i>No crecimiento</i>
<i>Agar Hecktoen</i>	Shigella flexneri	Colonias verdes
	K Pneumoniae	Colonias amarillas



- Pruebas Diferenciales.

GSe deben evaluar los medios y reactivos utilizados en algunas reacciones diferenciales con bacterias que reaccionen de positiva y negativa en cada prueba como se resume en la tabla número 5.

TABLA N° 5. PRUEBAS DIFERENCIALES

<i>Pruebas diferenciales</i>	<i>Resultados esperados</i>	
	<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
Coagulasa	<i>S aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>
Catalasa	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
Oxidasa	<i>Pseudomonas</i>	<i>E coli</i>



<i>Cloruro de sodio 6,5 en Caldo Nutritivo</i>	Sensible= <i>Enterococcus faecalis</i> Resistente= No Enterococcus
<i>Discos de Optoquina</i>	Sensible= <i>S. pneumoniae</i> Resistente= <i>S. viridans</i>
<i>Discos de Bacitracina</i>	Sensible= <i>S. pyogenes</i> Resistente= diferente grupo A

Control de calidad de las pruebas bioquímicas usadas en el laboratorio para identificación de microorganismos.

La tabla número 6 resume el uso de cultivos conocidos de especies representativas para control de calidad de pruebas bioquímicas.

TABLA N° 6. Uso de cultivos conocidos de bacterias para control de calidad de pruebas bioquímicas.

Medios de cultivo Reacción diferencial	Microorganismo control	Resultados esperados	
		<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>
Agua peptonada 2% producción de indol	<i>E coli</i>		Anillo rojo
	<i>E. aerogenes</i>	Anillo naranja	



Rojo de metilo Caldo buffer Glucosa peptona	<i>E. coli</i>		Cambio a color rojo
	<i>E. aerogenes</i>	No cambio de color	
VP Caldo buffer Glucosa peptona	<i>E. coli</i>	No cambio de color	
	<i>E. aerogenes</i>		Anillo rojo
Citrato de simmons	<i>E. coli</i> <i>E. aerogenes</i>	Verde No crecimiento	Azul crecimiento
Producción de Ureasa. Agar urea	<i>E. coli</i> <i>Proteus spp</i>	No cambio	Cambio a Rosado
Producción de H ₂ S TSI	<i>E. coli</i> <i>S. enteritidis</i>	H ₂ S negativo	H ₂ S positivo
Descarboxilación y desaminación de la lisina LIA	<i>S. enteritidis</i> <i>Citrobacterspp</i> <i>Morganella</i>	Desaminación{-} Desaminación{-} Desaminación{+} Bisel rojo	Descarboxilación {+} K/K Descarboxilación {-} K/A Descarboxilación {-} R/A
Ornitinadescarboxilasa Medio Mueller	<i>S. enteritidis</i> <i>Shigella flexneri</i>		R alcalina violeta R ácida amarilla
Arginina Dehidrolasa	<i>S. enteritidis</i> <i>Shigella flexneri</i>		R alcalina violeta R. ácida amarilla



- Control de calidad para el antibiograma:

- Debe mantenerse siempre un stock o lote suplente de discos de sensibilidad a menos 20°C en un desecador.
- El lote con que se está trabajando debe conservarse en el refrigerador de 2-8 °C, en un desecador.
- Se debe descartar cualquier disco de sensibilidad que haya pasado su fecha de expiración.
- Se recomienda el agar Mueller Hinton por la buena reproductividad que presenta en los diferentes lotes preparados.
- Algunos microorganismos pueden requerir la adición de 5% de sangre de caballo, cordero o conejo (no se puede usar sangre de cordero o conejo cuando se pruebe sensibilidad a las sulfonamidas).
- Debe probarse la esterilidad del lote adicionado sangre e incubándola por 24 horas; estas placas se descartan una vez comprobada la esterilidad del lote.
- Los medios preparados deben conservarse de 2-8°C en bolsas plásticas para impedir desecación.
- Se debe chequear el pH de cada lote el cual debe estar entre 7,2-7,4 a temperatura ambiente.
- Si se preparan placas normales se debe utilizar 25-30 ml de agar por placa.
- Si de preparan placas de mayor capacidad {15x150} debe agregarse 60 ml por placa.
- Es necesario probar la zona de inhibición de cada lote de discos de sensibilidad; para esto se debe disponer de un número de cepas patrones o cepas de referencia, como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *E. coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Los cultivos originales de estos microorganismos deben conservarse, a 20°C en sangre o suero o en estado liofilizado. Los cultivos de control rutinario deben ser guardados en refrigerador en agar nutritivo en tubo inclinado.



- Las cepas ATCC, deben ser utilizadas cada vez que se prepare un lote nuevo o cada vez que se pruebe un lote de discos de sensibilidad. La cepa de *Pseudomonasaeruginosa* es la más importante de todas, porque el contenido de cationes contenidos es la placa preparada de Mueller Hinton, es más crítico para ella que para cualquier de las otras 2.
- El tamaño de las zonas de inhibición obtenido en estas cepas, debe ser comparados con los resultados esperados, según la tabla de referencia, si ocurre alguna variación, debe revisarse la preparación de agar Mueller Hinton, o revisar los sensidiscos.
- El inóculo preparado debe ser siempre sobre el mismo medio líquido a una turbidez que no sobrepase la del tubo N° 0,5 de la escala Mc Farland correspondiente a $1,5 \times 10^8$ bacterias x ml.

- CONTROL DE ESTERILIDAD

El 5 % de cada lote de medio preparado, se apartará para efectuar un control de esterilidad, que consiste en comprobar la ausencia de crecimiento, después de 2 días de incubación, a 35 °C y 5 días a temperatura ambiente, para descartar hongos. Si no hay crecimiento en el grupo control se mantiene el resto del lote en el refrigerador hasta su utilización.

En el momento de empacar los agares, es preciso rotular en forma visible sobre cada placa, el nombre del medio de cultivo y la fecha de preparación; de esta forma será fácil, en todo momento identificarlo y saber el límite de su caducidad. Ver tabla número 7.



Tabla N° 7. Caducidad de algunos medios de cultivo empacados según T. ambiente de almacenamiento

MEDIOS DE CULTIVO	EN NEVERA A 4°C SIN BOLSA DE PLÁSTICO	EN NEVERA A 4°C EN BOLSA DE PLÁSTICO
Agar Sangre	15 días	50 días
Agar Chocolate	15 días	60 días
Agar Thayer Martin	15 días	60 días
Agar Mueller Hinton	15 días	70 días
Agar McConkey	15 días	70 días
Agar EMB	15 días	70 días
Agar Cled	15 días	70 días
Agar Saboureaud	21 días	90 días
Agar Manitol SALT	15 días	60 días
Agar SS	6 días	10 días

La anterior tabla expone datos sobre el tiempo de almacenamiento de algunos medios de cultivo conservados en nevera con o sin protección plástica.

VI. TALLER

- Preparar colorantes para Gram y ZN, preparar medios de cultivos y realizar.



BIBLIOGRAFÍA

1. GAMAZO C, LÓPEZ-GOÑI I. "Manual práctico de Microbiología". 3ª ed. Barcelona, Ed. Masson S.A., 2005.
2. BAILEY- SCOTT. Diagnóstico microbiológico IX edición. Buenos Aires Editorial Médica Panamericana 2004.
3. MURRAY PR, ROSENTHAL KS, KOBAYASHI GS, PFALLER MA. "Microbiología Médica". 4ª ed. Madrid, Ed. Mosby. Elsev Science. 2002.
4. WALKER T.S. "Microbiologic". Ed. McGraw-Hill Interamericana. México D.F., 2000.
5. KONEMAN, Elmer. ALLEN, Stephen. JANDA, William. Diagnostico. Microbiológico. 6º ed Buenos Aires Editorial. Panamericana. 2008.
6. VELEZ A, BORRERO R, RESTREPO A. Fundamentos de medicina.
7. Ennfermedades infecciosas. 6ª edición Medellín Editorial CIB.2004.
8. Guzmán, U. M. A, Manual de procedimiento bacteriológico para aislamiento e identificación de Enterobacterias 1º ed. Bogotá. INS, Colombia1999.



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

Campus Cartagena

Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla

Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 1319

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

