



DEPARTAMENTO DE APOYO AL DIAGNOSTICO

SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA

GUIA DE PROCEDIMIENTOS

MICROBIOLOGIA CLINICA





## INDICE

SECCION I: GENERALIDADES	4
1.1 OBJETIVO	4
1.2 CAMPO DE APLICACIÓN	4
SECCION II: MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	4
SECCION III: PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE MUESTRA.	6
3.1 OBTENCION DE MUESTRA DE SANGRE PARA CULTIVO	7
3.2 OBTENCION DE MUESTRA DE DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES	11
3.3 OBTENCION DE MUESTRAS DE ORINA PARA CULTIVO	13
3.4 OBTENCION DE LA MUESTRA PARA HERIDA OPERATORIA	14
3.5 OBTENCION DE LA MUESTRA DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR	15
3.6 OBTENCION DE LA MUESTRA SECRECION ENDOMETRIAL CULTIVO	15
SECCION IV: ENVIO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA	15
4.1 OBJETIVO	15
4.2 CONDICIONES GENERALES	16
4.3 PROCEDIMIENTO	16
4.4 CRITERIOS PARA RECHAZAR UNA MUESTRA	17
SECCION V PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO	20
5.1 SIEMBRA PRIMARIA DE ORINA	23
5.2 SIEMBRA PRIMARIA DE HEMOCULTIVO	24
5.3 SIEMBRA PRIMARIA DE PUNTA DE PUNTA DE DISPOSITIVO INTRAVASCULAR	25
5.4 SIEMBRA DE MUESTRA DE HERIDA OPERATORIA	28
5.5 SIEMBRA PRIMARIA DE TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR	30
5.6 SIEMBRA PRIMARIA DE SECRECION ENDOMETRIAL	30
SECCION VI IDENTIFICACION BACTERINA	30
6.1 IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS	37
6.2 IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVO	47
6.3 IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVO NO FERMENTADORES	55
SECCION VII PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA METODO DE DISCO DIFUSION	55
SECCION VIII CONTROL DE CALIDAD	56
SECCION IX REGISTROS	57
BIBLIOGRAFIA	





## PRESENTACIÓN

El presente “Manual de procedimientos de Laboratorio en Microbiología Clínica” es una herramienta básica y fundamental para mejorar la calidad de los análisis Microbiológicos que se realizan en el Hospital San Juan de Lurigancho, lo cual constituirá un valioso apoyo como herramienta de trabajo para los profesionales y técnicos que realizan los procedimientos para el diagnóstico de las diferentes enfermedades que afectan a la población que acude para su Diagnóstico y tratamiento.

Este Manual es el resultado de una revisión bibliográfica detallada y de un proceso de encuentros técnicos que surgió ante la necesidad de estandarizar metodologías, que permitieran unificar los conocimientos y velar en forma conjunta por la calidad que brindan el Servicio de laboratorio Clínico, de tal manera que proporcionará los elementos necesarios para lograr la confiabilidad de los resultados de laboratorio emitidos.

Sirva entonces este Manual como guía a todos los Profesionales del Laboratorio en el área de Microbiología Clínica, el cual ayudará a mejorar la calidad de los resultados.





## INTRODUCCIÓN

Este Manual de procedimientos es el resultado de un trabajo conjunto de los profesionales del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Lurigancho. En él se cristaliza gran parte del trabajo de los profesionales y técnicos, de la familia del Laboratorio Clínico. El propósito de este manual, es ofrecer un servicio profesional al laboratorio Clínico.

El laboratorio de análisis de Microbiología tiene que predisponer, documentar y mantener activo un sistema de calidad, para garantizar los requisitos especificados y la conformidad de los productos. Es tarea fundamental de un laboratorio el proveer resultados confiables, entendiendo por veracidad de los resultados analíticos, la precisión, la exactitud, la sensibilidad, la especificidad y la eficiencia instrumental. Para iniciar el Control de Calidad Interno en el Laboratorio Clínico se debe establecer un conjunto de acciones, para asegurar la calidad en los resultados finales, cubriendo así todas las fases del laboratorio. La veracidad, como índice de calidad, caracteriza de modo global un resultado analítico. Para lograr altos estándares de calidad es necesario el seguimiento, supervisión y evaluación de las diferentes fases del laboratorio: pre-analítica, analítica y post-analítica. Con este manual esperamos contribuir al mejoramiento de los procedimientos y servicios que prestan el Laboratorio Clínico.



R. RAMOS M



A. ROJAS

2



K. GALVEZ G.



A. CHIRIB H



## MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE MICROBIOLOGIA CLINICA

### Finalidad

- de muestras biológicas
- Envío y conservación de muestras
- Entrega de resultados

Exámenes urgentes El presente Manual de procedimiento explica la organización del laboratorio de análisis y sus relaciones con los clientes externos e internos de acuerdo con la modalidad de:

- Acceso a las prestaciones diagnósticas
- Ejecución
- Validación del trabajo

### Ámbito de referencia

El presente procedimiento está aplicado a un laboratorio de análisis, desde las secciones hospitalarias, y al lugar de toma de muestras, y a los lugares de entrega de resultados.

### Responsabilidad

La responsabilidad debe ser conocida y distribuida según sus funciones por:

- El Director del Hospital
- El responsable del laboratorio
- Los responsables de las diferentes secciones del laboratorio



R. RAMOS M



A. ROJAS

3



K. GARCÍA



A. Calero H.



## SECCION I GENERALIDADES

### 1.1 Objetivo

Realizar procedimientos de Siembra de muestras microbiológicas que se reciben en nuestro laboratorio para cultivos en forma correcta para obtener resultados confiables.

### 1.2 Campo de Aplicación

Obtención de muestras de los pacientes

Envío de muestras al laboratorio

Procedimientos en el laboratorio para el aislamiento e identificación

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

Control de calidad y registros necesarios para su control

## SECCION II MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

2.1 El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico de infecciones intrahospitalarias debe aplicar las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de Bioseguridad. Serie Normas Técnicas.

2.2 Se deben controlar las medidas necesarias aplicables a:

2.2.1 El personal.

2.2.2 La vestimenta.

2.2.3 Los ambientes.

2.2.4 La obtención de muestras.

2.2.5 El envío de muestras al laboratorio.

2.2.6 Los casos de accidentes.

2.2.7 El laboratorio.

## SECCION III PROCEDIMIENTOS DE OBTENCION DE MUESTRA

La efectividad de un laboratorio microbiológico y el éxito de los procedimientos dependen en gran medida del modo de obtención, transporte, rapidez y oportunidad con que las muestras llegan al laboratorio. Estos procedimientos son prioritarios para que el laboratorio contribuya eficientemente en el diagnóstico, es por ello que todos los miembros del equipo de salud involucrados deben entender la naturaleza crítica de mantener la calidad de la muestra durante todo el proceso.





### 3.1 OBTENCION DE MUESTRA DE SANGRE PARA CULTIVO

#### 3.1.1 Condiciones específicas

3.1.1.1 El momento óptimo de obtención de la muestra para hemocultivo es justo antes del pico más alto de fiebre, sin embargo esta situación ideal no es frecuente. Alternativamente las muestras pueden obtenerse de acuerdo con el caso. Por ejm.

- BACTEREMIAS CONTINUAS: En cualquier momento, ejm. Endocarditis.
- BACTEREMIAS INTERMITENTES: Una hora antes del pico febril, ejm. Brucelosis.

#### 3.1.1.2 Guía para la cronología y el número de cultivos de sangre en adultos:

- En sepsis: Se debe tomar dos a tres muestras de lugares diferentes en un lapso de diez minutos
- En endocarditis aguda: Obtener tres muestras de tres lugares diferentes en un lapso de 1 a 2 horas.
- En endocarditis subaguda: Obtener tres muestras de tres lugares diferentes a intervalos de al menos quince minutos. Si el cultivo es negativo a las 24 horas, obtener tres muestras más.
- En fiebre de origen desconocido: Obtener dos o tres muestras de lugares diferentes con diferencia de una hora o más entre una y otra muestra. Si el cultivo es negativo a las 24 horas, obtener dos a tres muestras más.

#### 3.1.2 Obtención de muestra de sangre mediante uso de jeringa:

- Remitirse al Manual de Procedimientos de Laboratorio Para la Obtención y Envío de Muestras SERIE DE NORMAS TECNICAS N° 15, 2da ed. 1997. Capítulo II. 2.2 Procedimiento de Obtención de Sangre Mediante Uso de Jeringa,
- La proporción entre el volumen de sangre obtenida y el volumen del caldo de cultivo debe estar en una relación de 1:5 - 1:10.
- El volumen de sangre dependerá de la edad del paciente; por cada venopunción se recomienda:
  - Adultos: 10 - 30 ml
  - Niños: 1 - 5 ml
  - Lactantes: 1 - 2 ml
  - Neonatos: 0.5 - 1 ml

#### 3.1.3 Inoculación de la muestra de sangre al medio de cultivo

3.1.3.1 Utilizar un medio bifásico o monofásico para este procedimiento. Desinfectar el diafragma del frasco de hemocultivo con alcohol de 70% o alcohol yodado.



5





- 3.1.3.2 Inocular la muestra de sangre al frasco con medio de cultivo a través del diafragma. Debe realizarse inmediatamente de obtenida la muestra para evitar que se coagule.
- 3.1.3.3 Mezclar el contenido del frasco inclinándolo suavemente dos o tres veces. En caso que se use el medio bifásico, bañar la fase sólida con la sangre.
- 3.1.3.4 Descartar la aguja y la jeringa en un contenedor resistente a las punturas. No volver a introducir la aguja en su funda.
- 3.1.3.5 Limpiar la tapa del frasco. Etiquetar el frasco apropiadamente indicando además el número de hemocultivo.
- 3.1.3.6 Transportar el hemocultivo inmediatamente al laboratorio de acuerdo a la norma 1.6.5.

**NOTA:** Si por alguna razón se obtiene menor volumen de sangre que el deseado, no debe descartarse.

**3.1.4 Referencias:**

- Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas. Curso Teórico Práctico. En: *Diagnóstico de laboratorio de infecciones respiratorias agudas y enterovirus*. Lima. 1999.
- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. 3a ed Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1992.
- Miller J. Michael, Holmes H. Specimen collection, transport and storage. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 33 – 63.
- OMS *Manual for the National Surveillance of Antimicrobial Resistance of S. pneumoniae and H. influenzae: Epidemiological and Microbiological methods*. Programme for the Control of Acute Respiratory Infections. Atlanta. 1994.

**3.2 OBTENCION DE MUESTRA DE DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES**

**3.2.1 Objetivo**

Describir el procedimiento de obtención de muestra de dispositivos intravasculares.

**3.2.2 Campo de Aplicación**

- a) Gasa estéril







- b) Tijera estéril
- c) Tubo o frasco con tapa rosca estéril
- d) Guantes de látex estériles
- e) Refrigeradora

### 3.2.4 Procedimiento

- a) Limpiar la piel con alcohol de 70° alrededor de la inserción del catéter.
- b) Retirar el catéter en forma aséptica, cortar a 5 cm de la punta distal del catéter dejando caer directamente en un tubo o frasco vacío estéril con tapa rosca.
- c) Rotular y transportar la muestra inmediatamente al laboratorio de microbiología en un periodo **NO MAYOR DE 15 MINUTOS A TEMPERATURA AMBIENTE** para prevenir que se seque.
- d) Registrar el procedimiento.
- e) En el caso de no poder enviarse inmediatamente al laboratorio, la muestra debe mantenerse refrigerada a 4° C hasta por 24 horas.

Se aplica en la obtención de muestras para el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos intravasculares del torrente sanguíneo.

Los dispositivos intravasculares en los que puede realizarse cultivos semicuantitativos son: central, Hickman, Brovac, periférico, arterial, umbilical, de nutrición parenteral total, Swan Ganz.

### 3.2.5 Materiales

- a) Alcohol 70%

### 3.2.6 Referencias:

- Miller J. Michael, Holmes H. Specimen collection, transport and storage. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 33 – 63.

## 3.3 OBTENCION DE MUESTRA DE ORINA PARA CULTIVO

### 3.3.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestras de orina para cultivo, obtenida del chorro medio, por aspiración de catéter vesical permanente y por aspiración suprapúbica,

### 3.3.2 Campo de Aplicación

El presente procedimiento se aplica en la obtención de muestras de orina de pacientes para el diagnóstico de infecciones del tracto urinario.

### 3.3.3 Condiciones Generales

La orina es un excelente medio de cultivo para la proliferación bacteriana, por esta razón, la muestra debe ser procesada dentro de las 2 horas después de haber sido obtenida o debe



R. RAMOS M



A. ROJAS

7



A. CALVO H



refrigerarse a 4° C (máximo 24 horas) hasta su procesamiento.

Generalmente el desarrollo de dos o más tipos de colonias (en pacientes sin sonda vesical) indica que la muestra se ha contaminado por recolección incorrecta o demora en la siembra.

### 3.3.4 OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ORINA DEL CHORRO MEDIO

#### 3.3.4.1 Obtención de muestras de orina en pacientes mujeres

##### hospitalizadas Materiales y equipos

- Guantes de látex estériles
- Cinco o más piezas de gasa estéril de tamaño adecuado pudiendo ser de 4" x 4"
- Jabón
- Agua tibia estéril
- Frasco estéril de boca ancha para la muestra de orina

##### Procedimiento

- Mantener la privacidad de la paciente.
- Rotular el frasco con el nombre de la paciente, fecha de obtención de la muestra, hora y el procedimiento a utilizar para la obtención de la muestra.
- Lavarse las manos con jabón y abundante agua.
- Preparar una pieza de gasa para la limpieza de los genitales externos humedeciéndola con agua y una pequeña cantidad de jabón. Preparar dos piezas más de gasa para el enjuague con agua tibia.
- Separar los labios mayores con dos dedos de una mano y limpiar el área expuesta pasando la gasa de adelante hacia atrás.
- Descartar la gasa.
- Con otra gasa humedecida enjuagar el área de adelante hacia atrás. Repetir el procedimiento con otra gasa.
- Finalmente secar el área de adelante hacia atrás con un trozo de gasa seca.
- Mantener separados los labios mayores mientras la paciente empieza a orinar. Luego del chorro inicial colocar el frasco estéril para coleccionar el chorro medio.
- Al terminar de orinar, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo.
- Transportar el frasco con la muestra de orina inmediatamente al laboratorio de acuerdo a la norma 1.6.5.

#### 3.3.4.2 Obtención de muestra de orina en pacientes

##### varones Materiales

- Guantes de látex
- Cinco o más piezas de Gasa estéril
- Jabón
- Agua tibia estéril
- Frasco estéril de boca ancha para la obtención de la muestra

##### Procedimiento





- a) Mantener la privacidad de la paciente.

3.3.4.3 Rotular el frasco con el nombre de la paciente, fecha de obtención de la muestra, hora y el procedimiento a utilizar para la obtención de la muestra.

### 3.3.4.4 Obtención de muestra de orina en pacientes

#### varones Materiales

- a) Guantes de látex
- b) Cinco o más piezas de Gasa estéril
- c) Jabón
- d) Agua tibia estéril
- e) Frasco estéril de boca ancha para la obtención de la muestra

#### Procedimiento

- b) Mantener la privacidad de la paciente.
- c) Rotular el frasco con el nombre de la paciente, fecha de obtención de la muestra, hora y el procedimiento a utilizar para la obtención de la muestra.
- d) Lavarse las manos con jabón y abundante agua.
- d) Preparar una pieza de gasa con agua y una pequeña cantidad de jabón. Preparar dos piezas más de gasa para el enjuague con agua tibia.
- e) Realizar la higiene de los genitales. Retraer el prepucio antes de lavar el glande con la gasa humedecida con jabón. Descartar la gasa.
- f) Enjuagar el glande, usando una gasa húmeda. Repetir el procedimiento con otra gasa.
- g) Secar la zona, usando uno o más piezas de gasa seca.
- h) Indicar al paciente que mantenga el prepucio retirado e inicie la micción directamente en un recipiente (orina para descartar).
- i) Después del chorro inicial colocar el frasco estéril para coleccionar la muestra del chorro medio.
- j) Obtenida la muestra, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo.
- k) Transportar el frasco con la muestra de orina inmediatamente al laboratorio.

### 3.3.5 OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ORINA POR ASPIRACIÓN DE CATETER VESICAL PERMANENTE

#### Material

- a) Guantes de látex estériles
- b) Jeringa descartable estéril
- c) Aguja descartable estéril N° 21
- d) Tubo o frasco estéril para la muestra
- e) Alcohol 70%

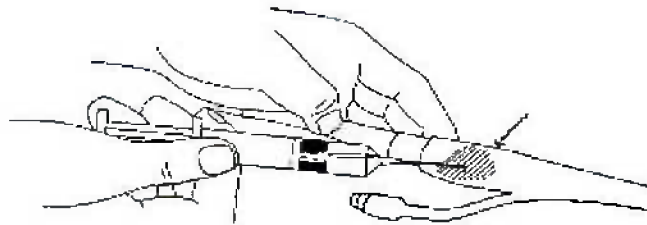
#### Procedimiento

- a) Rotular el frasco con el nombre de la paciente, fecha de obtención de la muestra, hora y el procedimiento a utilizar para la obtención de la muestra.





- b) Desinfectar con alcohol 70%, el extremo proximal del catéter (lo más cerca al punto de inserción), donde se realizará la punción.
- c) Realizar una punción en el área desinfectada y con la jeringa obtener la muestra: 5mL a 10 mL de orina idealmente (Véase Figura 6).
- d) Vaciar la orina en un tubo o recipiente estéril evitando que el cuello de la jeringa toque superficies no estériles, por ejemplo las paredes externas del tubo o frasco.
- e) Tapar o cerrar herméticamente el tubo o frasco.
- f) Transportar el frasco con la muestra de orina inmediatamente al laboratorio de acuerdo a la norma 1.6.5.



### 3.3.6 OBTENCION DE MUESTRA DE ORINA POR ASPIRACION SUPRAPUBICA

#### 3.3.6.1 Condiciones Generales

Ocasionalmente puede ser necesaria la aspiración suprapúbica de la vejiga, por lo general cuando se trata de niños pequeños. El procedimiento es efectuado por el médico especialista asegurando que el paciente esté con la vejiga llena y realizando una punción directa de la vejiga a través de la pared abdominal con aguja y jeringa.

La obtención de muestra la debe realizar el médico especialista siguiendo los procedimientos normativos de su Institución.

#### 3.3.6.2 Procedimiento

- a) Rotular el frasco con el nombre del paciente, fecha de obtención de la muestra, hora y el procedimiento a utilizar para la obtención de la muestra.
- b) Colocar en el recipiente estéril la orina obtenida por aspiración.
- c) Tapar el recipiente.
- d) Llevar la muestra inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.

NOTA: En niños, para obtener la muestra del chorro medio es mejor estar pendiente del momento en que el niño tenga deseos de miccionar.

#### 3.3.6.3 Referencias:

- Miller J. Michael, Holmes H. Specimen collection, transport and storage. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 33 – 63.





- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. 3a ed Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.. 1992.
- OPS. Vol IV *Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias*. Serie HSP/ Manuales Operativos Paltext. N°13, USA. 1996

### 3.4 OBTENCION DE MUESTRA DE HERIDA OPERATORIA

#### 3.4.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestra de herida operatoria para el diagnóstico en laboratorio de bacterias aeróbicas.

#### 3.4.2 Obtención de muestra de herida operatoria con hisopo

En el caso de una herida operatoria con sospecha de infección, la muestra se obtiene con hisopo.

##### Materiales

- a) Guantes de látex estéril
- b) Solución salina estéril
- c) Jabón
- d) Gasa estéril
- e) Hisopos estériles de algodón
- f) Medio de transporte de Stuart o Amies con carbón
- g) Lámina portaobjeto
- h) Tubo estéril (opcional)

##### Procedimientos

- a) Colocarse los guantes de látex.
- b) Realizar una buena asepsia de los bordes de la herida con agua y jabón. La limpieza debe realizarse de adentro hacia fuera en forma concéntrica.
- c) Retirar el exudado de la superficie enjuagando y limpiando con solución salina estéril (también se puede usar agua estéril).
- d) Separar suavemente los bordes de la herida con el pulgar e índice de una mano.
- e) Con la otra mano, cuidando de no tocar los bordes cutáneos adyacentes introducir la punta del hisopo en la profundidad de la herida. Obtener la muestra rotando el hisopo y avanzando hacia fuera sin tocar el borde de la herida.
- f) Obtener dos muestras:
  - Una muestra para cultivo la cual se introduce en un medio de transporte (Stuart o Amies con carbón).
  - La segunda muestra se obtiene para realizar una coloración Gram. Realizar el frotis inmediatamente después de haber obtenido la muestra cuidando que éste no sea muy grueso.
- g) En el medio de transporte se puede mantener la muestra a temperatura ambiente hasta 24 horas.

#### 3.4.3 Obtención de muestra de absceso por aspiración con aguja:





El método indicado para obtener muestras de abscesos es por aspiración con aguja.

#### Materiales

- a) Guantes de látex estériles
- b) Jeringa estéril
- c) Aguja adecuada (recomendable aguja N° 18 a 20)
- d) Solución salina estéril
- e) Jabón
- f) Gasa estéril
- g) Tubo estéril (opcional)
- h) Medio de transporte de Stuart o Amies con carbón

#### Procedimiento

- a) Colocarse los guantes de látex.
- b) Realizar una buena limpieza de la superficie con agua y jabón. La limpieza debe realizarse de adentro hacia afuera en forma concéntrica.

#### Materiales

- i) Guantes de látex estéril
- j) Solución salina estéril
- k) Jabón
- l) Gasa estéril
- m) Hisopos estériles de algodón
- n) Medio de transporte de Stuart o Amies con carbón
- o) Lámina portaobjeto
- p) Tubo estéril (opcional)

#### Procedimientos

- h) Colocarse los guantes de látex.
- i) Realizar una buena asepsia de los bordes de la herida con agua y jabón. La limpieza debe realizarse de adentro hacia fuera en forma concéntrica.
- j) Retirar el exudado de la superficie enjuagando y limpiando con solución salina estéril (también se puede usar agua estéril).
- k) Separar suavemente los bordes de la herida con el pulgar e índice de una mano.
- l) Con la otra mano, cuidando de no tocar los bordes cutáneos adyacentes introducir la punta del hisopo en la profundidad de la herida. Obtener la muestra rotando el hisopo y avanzando hacia fuera sin tocar el borde de la herida.
- m) Obtener dos muestras:
  - Una muestra para cultivo la cual se introduce en un medio de transporte (Stuart o Amies con carbón).
  - La segunda muestra se obtiene para realizar una coloración Gram. Realizar el frotis inmediatamente después de haber obtenido la muestra cuidando que éste no sea muy grueso.
- n) En el medio de transporte se puede mantener la muestra a temperatura ambiente hasta 24 horas.





- c) Desinfectar la superficie con alcohol 70% o yodo - povidona.
- d) Introducir la aguja a través de la piel y/o la pared del absceso y aspirar aproximadamente 1 mL del material purulento con la jeringa.
- e) Colocar la muestra en un tubo estéril y enviar al laboratorio de acuerdo a los procedimientos indicados en la norma 1.6.5.
- f) Si el transporte de la muestra al laboratorio demora más de 20 - 30 minutos se debe mantener en medios de transporte como Stuart o Amies con carbón.
- g) En el medio de transporte, la muestra puede permanecer a temperatura ambiente hasta

### 3.4.3 Referencias:

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. 3a ed Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1992.
- Miller J. Michael, Holmes H. Specimen collection, transport and storage. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 33 - 63.

## 3.5 OBTENCION DE MUESTRAS DE SECRECIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

### 3.5.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestras de secreciones del tracto respiratorio inferior para realizar el diagnóstico microbiológico mediante cultivos.

### 3.5.2 Condiciones Específicas

Las muestras de lavado broncoalveolar, cepillado bronquial o aspirado transtraqueal deben ser obtenidas por profesional especializado siguiendo los procedimientos normativos de su institución.

### 3.5.3 Materiales

- a) Recipiente estéril o tubo estéril.
- b) Tubo estéril con 1 mL de suero fisiológico estéril o caldo tripticasa soya.

### 3.5.4 Procedimiento

- a) Colocar el aspirado transtraqueal o lavado broncoalveolar en un recipiente estéril (mínimo 1 mL de muestra) y el cepillo en un tubo con 1 mL de solución salina estéril o caldo tripticasa soya o infusión cerebro - corazón.
- b) Para el análisis cuantitativo de lavado broncoalveolar se debe transportar un volumen mínimo de 1 mL (en el proceso generalmente se obtiene de 40 mL a 80 mL de fluido).
- c) Para el análisis cuantitativo de la muestra obtenida por cepillo, ésta se debe colocar en 1 mL de caldo tripticasa soya o suero fisiológico y transportarla inmediatamente al



13





laboratorio.

- d) De no ser así, éstas se pueden mantener en las condiciones arriba mencionadas, hasta por 2 horas a temperatura ambiente (15 a 30 minutos para volúmenes pequeños) ó 24 horas en refrigeración a 4° C.

### 3.5.5 Referencias

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. 3a ed Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1992.
- Reischer B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp. 64 -104.

## 3.6 OBTENCION DE MUESTRA DE SECRECION ENDOMETRIAL PARA CULTIVO

### 3.6.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestras en casos de endometritis para el diagnóstico bacteriológico mediante cultivo.

### 3.6.2 Campo de aplicación

Se aplica en la obtención de muestras para el diagnóstico de laboratorio de bacterias aerobias en casos de endometritis...

### 3.6.3 Condiciones Específicas

La endometritis pertenece al grupo de infecciones definidas como infecciones del tracto reproductivo. Las muestras deben ser tomadas por profesional especializado siguiendo los procedimientos normativos de su Institución.

### 3.6.4 Materiales

- a) Medio de transporte de Stuart o Amies con carbón.
- b) Hisopo con punta de algodón.
- c) Tubo estéril con tapa rosca.

### 3.6.5 Procedimiento

#### Muestra obtenida mediante hisopo

- a) Obtener dos muestras de secreción endometrial, una para cultivo y la otra para un frotis directo y coloración Gram. Realizar este procedimiento inmediatamente después de obtener la muestra.







- b) El hisopo con la muestra obtenida para cultivo debe colocarse en el medio de transporte.
- c) Mantener a temperatura ambiente.
- d) Enviar la muestra al laboratorio antes de las 24 horas.

**Muestra obtenida por aspiración**

- a) Colocar el aspirado de la secreción endometrial en un tubo estéril y llevar inmediatamente al laboratorio para su procesamiento por cultivo y coloración Gram.
- b) Mantener a temperatura ambiente.
- c) Enviar la muestra al laboratorio antes de las 2 horas.

**3.6.6 Referencia:**

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. 3a ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1992.

**SECCION IV**

**ENVÍO Y TRANSPORTE DE MUESTRA**

**4.1 OBJETIVO**

Describir el procedimiento y condiciones para el transporte de muestras al laboratorio.

**4.2 CONDICIONES ESPECIFICAS**

La muestra debe ser mantenida lo más cerca posible de su estado original, debiendo evitarse temperaturas extremas o desecamientos excesivos.  
Por lo general, volúmenes de 1 - 5 mL de muestra deben enviarse al laboratorio dentro de 15 a 30 minutos.

**4.3 PROCEDIMIENTO**

- a) Para su transporte al laboratorio se colocan las muestras en un envase secundario, el cual puede ser de material plástico u otro resistente a roturas o filtraciones.
- b) Todas las muestras son enviadas al laboratorio lo más pronto posible dentro de las dos horas de haber sido obtenidas, a excepción de los dispositivos intravasculares que no se debe exceder de los 15 minutos. Si el proceso va a demorar, pueden mantenerse bajo las condiciones mencionadas por tipo de muestra en los medios de transporte que se recomiendan.
- c) Por lo general no se almacenan las muestras por más de 24 horas.
- d) En caso sea necesario transferir las muestras a otros laboratorios, los responsables de su envío eligen el sistema de embalaje apropiado para la conservación de las muestras durante el tiempo que demanda el transporte hasta llegar al laboratorio.

**4.3.1 Antes de rechazar una muestra debido a una información inapropiada o incompleta, debe**



A. Caldero H.



establecerse contacto con la persona responsable para efectuar las correcciones necesarias para así poder completar la información.

#### 4.4 CRITERIOS PARA RECHAZAR UNA MUESTRA

4.4.1 Debe controlarse cada hoja de pedido y etiqueta de la muestra para ver si se ha incluido toda la información esencial.

4.4.2 Antes de rechazar una muestra debido a una información inapropiada o incompleta, debe establecerse contacto con la persona responsable para efectuar las correcciones necesarias para así poder completar la información.

4.4.3 Es necesario seguir estrictamente los procedimientos descritos, ya que la muestra obtenida puede ser rechazada por el personal de laboratorio de acuerdo a los siguientes criterios:

- a) No indicar tipo de muestra o procedencia
- b) No indicar tipo de examen en la orden
- c) Inadecuada temperatura de transporte
- d) Demora en el envío al laboratorio
- e) Medio de transporte inadecuado
- f) Muestra sin rotular o mal rotulada
- g) Muestra que tenga evidencias de haberse derramado
- h) Recipiente inadecuado (con rajaduras por ejemplo)
- i) Muestra con contaminación obvia
- j) Muestra seca en el hisopo
- k) Una sola muestra de hisopado con varias ordenes
- l) Volumen inadecuado

4.4.4 En casos de muestras rechazadas el personal de laboratorio debe explicar al médico solicitante las razones y observaciones en la ficha de solicitud de diagnóstico correspondiente. En el caso de muestras que no puedan ser obtenidas nuevamente, la interpretación de la coloración Gram debe ser revisada cuidadosamente.

4.4.5 Es importante el examen microscópico del material clínico, ya que permite conocer no sólo la calidad de la muestra, sino también la presencia de microorganismos, lo que proporciona suficiente información para un diagnóstico presuntivo inmediato.

#### 4.5 Referencias:

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. 3a ed Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1992.
- Miller J. Michael, Holmes H. Specimen collection, transport and storage. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 83 - 63.





## SECCION V

### PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

Las bacterias para su desarrollo requieren de sustancias nutritivas cuyos componentes básicos deben satisfacer las mínimas exigencias nutricionales y condiciones de atmósfera (aerobiosis, anaerobiosis, microaerofilia), pH y temperatura óptima para su crecimiento in vitro.

La elección de los medios de cultivo se realiza en función a la localización de las infecciones y las bacterias a investigar. Los errores cometidos durante este paso del ciclo de procedimientos pueden invalidar la lectura e interpretación de los cultivos.

#### 5.1 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE ORINA

##### 5.1.1 Objetivo

Describir el procedimiento para la siembra primaria de muestra de orina

##### 5.1.2 Campo de aplicación

Se aplica para el cultivo de muestra de orina en el diagnóstico bacteriológico de infecciones del tracto urinario

##### 5.1.3 Materiales y equipos

- Asa-calibrada de platino o descartable de 0.001mL, 0.01 mL
- Estufa de 35 – 37° C
- Mechero Bunsen o Cabina de Flujo laminar
- Guantes de látex
- Contenedor de material contaminado
- Pinza estéril
- Propipeta o pipetor automático
- Medios de cultivo
  - Placas con agar sangre de carnero (AS) – Placas con agar McConkey (McC)

##### 5.1.4 Procedimiento

- Mantener las muestras en refrigeración (4° C) hasta su procesamiento por cultivo.
- Los cultivos deben realizarse en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero Bunsen.





- c) Las placas con AS y McC que se utilizarán en el urocultivo deben estar a temperatura ambiente. Rotular las placas.
- d) Si el asa calibrada no es descartable, esterilizar el asa de siembra flameándola en el mechero Bunsen hasta que se ponga rojo vivo. Dejar enfriar el asa contando hasta 20.
- e) Tomar el frasco con la muestra de orina, abrir la tapa y flamear la boca del frasco en el mechero Bunsen.
- f) Tomar la muestra de orina con el asa de siembra estéril introduciéndola y sacándola del frasco en forma vertical (Véase Figura 7a). Tapar el frasco con la muestra.
- g) Inocular en el centro de la placa con AS a partir del cual se extiende la muestra, hacia delante y hacia atrás (Véase Figura 7b).
  
- h) Luego, sin quemar el asa, el inóculo se disemina uniformemente con trazos perpendiculares a la siembra inicial en toda la placa (Véase Figura 7c).
- i) Proceder de la misma forma para el agar Mc Conkey.
- j) Esterilizar el asa de siembra en el mechero.
- k) Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba. Incubar la placa de AS y Mc Conkey a 35 - 37° C en condiciones aeróbicas por 24 horas.





Asas de siembra recomendadas para cada método de muestras de orina

Fuente / METODO	Asa recomendada	
	0.001 mL (*)	0.01 mL (**)
Chorro medio	X	
Catéter	X	
Aspiración suprapúbica		X

(\*) Una colonia = 1000 UFC/ ML



Figura 7a. Método para introducir el asa calibrada en la muestra de orina para asegurar que se retire una cantidad apropiada.



Figura 7b.. Sin flamear el asa estriar atravesandola línea del inoculo en el sentido de las flechas.

Figura 7: Método para sembrar con asa calibrada





### 5.1.5 Lectura

- Realizar la evaluación a las 24 horas, si no hay crecimiento bacteriano dejar incubar hasta las 48 horas.
- La evaluación consiste en el recuento de colonias y se multiplica por el factor de dilución para obtener las UFC por mL.

### 5.1.6 Interpretación

- En pacientes sin sonda vesical, la cuenta significativa de bacterias en orina es la presencia de más de  $10^5$  UFC / mL de un solo germen.
- Los recuentos intermedios ( $10^3$  -  $10^4$  UFC / mL) indican infección si el procedimiento de recolección de orina fue realizado correctamente.
- Generalmente, el aislamiento de tres o más especies bacterianas indican que la muestra se ha contaminado por recolección inadecuada o demora en la siembra.
- En pacientes con sonda vesical, cuentas bacterianas menores de  $10^5$  UFC / mL pueden tener significado, así también se pueden encontrar bacteriurias poli microbianas hasta en casi 15% de enfermos.
- En pacientes sin catéter se puede comprobar si el procedimiento de obtención de muestra fue realizado correctamente observando la frecuencia con la cual se informan recuentos de colonias intermedias entre  $10^3$  -  $10^4$  UFC / mL. En pacientes sin infecciones del tracto urinario, el recuento es nulo o se reduce a pocas colonias.
- En muestras obtenidas por punción suprapúbica, el desarrollo de una sola colonia en el medio de cultivo indica infección del tracto urinario.

NOTA 1: Se usará asas de siembra 0.001 mL para todas las muestras de orina a excepción de aquellas procedentes de aspirados supra púbcos, de infantes, de niños y de pacientes con tratamiento antimicrobiano, las cuales se inocularán con asas de 0.01 mL debido a que en dichos pacientes pueden haber infecciones del tracto urinario asociados a recuentos menores de  $10^5$  UFC/mL.

NOTA 2: De no contar con asa calibrada, utilizar tips estériles y micro pipeta de  $1\mu\text{L}$  o  $10\mu\text{L}$ .

### 5.1.7 Referencias

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. 3a ed Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1992.

## 5.2 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HEMOCULTIVO

### 5.2.1 Objetivo

Describir la técnica de siembra primaria de hemocultivo para el aislamiento de bacterias





causantes de infecciones del torrente sanguíneo.

### 5.2.2 Campo de aplicación

Se aplica para el aislamiento bacteriano a partir de hemocultivos en el diagnóstico bacteriológico de infecciones del torrente sanguíneo.

### 5.2.3 Materiales y equipos

- Estufa de 35 – 37° C
- Mechero Bunsen o Cabina de Flujo laminar
- Jeringa estéril
- Guantes de látex
- Alcohol al 70%
- Contenedor de material contaminado
- Medios de cultivo
  - Medio bifásico Ruiz Castañeda o monofásico – Agar sangre de carnero de carnero (AS).
  - Agar Mc Conkey (McC)
  - Se puede incluir otros medios (ejm. manitol salado)

### 5.2.4 Procedimiento

- Incubar el frasco de hemocultivo a 35 – 37° C hasta por 7 días.
- Bañar la superficie de agar con el caldo inclinando el frasco suavemente.
- Examinar visualmente y con luz transmitida los frascos de hemocultivo después de 12 y 24 horas de incubación.
- La observación de turbidez o lisis de los glóbulos rojos es indicativa de crecimiento bacteriano; entonces se realizará una coloración Gram y un subcultivo. En los medios bifásicos el desarrollo también se puede evidenciar en la fase sólida mediante la formación de colonias
- Si no se observa lisis de los glóbulos rojos o turbidez en el caldo, o colonias en la fase sólida, continuar observando todos los días para ver si aparecen signos de crecimiento, hasta siete días después de haber iniciado el procedimiento.

### 5.2.5 Subcultivo

- Los subcultivos deben realizarse en cabina o cerca de un mechero de Bunsen.
- Realizar subcultivos ciegos dentro de las 12 y 24 horas de incubación.
- Para realizar los subcultivos desinfectar la superficie de la tapa del frasco con alcohol de 70%.
- Con una jeringa estéril, extraer a través del tapón de jebes la muestra de sangre.
- Inocular una gota de la muestra del hemocultivo en un extremo de la superficie de las placas de agar sangre, agar Mac conkey y colocar cuidadosamente una gota sobre una lámina portaobjetos para hacer un frotis y coloración Gram.
- Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en los cuatro cuadrantes de





- la placa, con el propósito de obtener colonias aisladas (Véase Figura 8).
- g) Incubar las placas de AS y agar McC a 35 - 37° C por 24 horas.
  - h) Observar la lámina coloreada y buscar la presencia de bacterias.
  - i) Si no hay crecimiento a las 24 horas seguir incubando hasta por 48 horas.
  - j) Si no hubiera desarrollo bacteriano, repetir el procedimiento al 5° y 7° día.

**NOTA:** Se recomienda usar una jeringa de tuberculina.

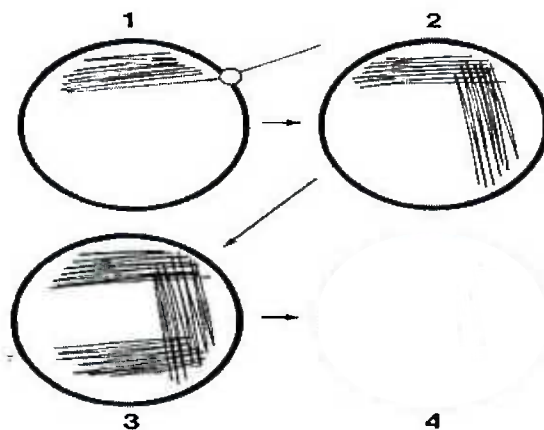


Figura 8: Siembra por dispersión agotamiento

### 5.2.6 Lectura de subcultivos

- a) A las 24 horas observar el crecimiento de colonias. Si no se observa desarrollo, incubar 24 horas más.
- b) Cuando se ha confirmado crecimiento bacteriano por subcultivo, se puede descartar el frasco de hemocultivo siguiendo los procedimientos de bioseguridad.
- c) En algunos casos el frasco de hemocultivo debe ser retenido para mayor estudio.
- d) En la interpretación de los resultados deben considerarse los datos clínicos individuales. *Staphylococcus coagulasa* negativo, corinebacterias y especies de *Bacillus* son contaminantes frecuentes y a menudo se aíslan en sólo una de tres muestras. Si no hay leucocitos y el paciente no tiene factores de riesgo para bacteriemia por estos gérmenes como inmunosupresión, prótesis, líneas de acceso vascular e historia de adicción a drogas intravenosas se puede concluir que la presencia de estos gérmenes se debe a contaminación. Se informará el resultado de cada frasco de hemocultivo individualmente

### 5.2.7 Referencias

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 3a ed. 1992, Buenos Aires.







- OPS. Vol IV *Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias*. Serie HSP/ Manuales Operativos Paltex. N°13, USA. 1996.
- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, Garcia L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 64 – 104.

### 5.3 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE PUNTA DE DISPOSITIVO INTRAVASCULAR

#### 5.3.1 Objetivo

Describir los procedimientos de la siembra primaria de muestra de punta de dispositivo intravascular.

#### 5.3.2 Campo de Aplicación

Se lleva a cabo para determinar si la infección del torrente sanguíneo está relacionada al dispositivo intravascular. La técnica que se describirá es la de Maki y colaboradores (método semicuantitativo).

#### 5.3.3 Materiales y Equipos

- a) Pinza estéril
- b) Estufa de 35 - 37°C
- c) Mechero Bunsen o Cámara de Flujo laminar
- d) Guantes de látex
- e) Contenedor de material contaminado

#### Medio de Cultivo:

– Agar sangre de carnero (AS)

#### 5.3.4 Procedimiento

- a) La placa conteniendo el agar sangre de carnero debe encontrarse a temperatura ambiente.
- b) Flamear la pinza y dejar enfriar.
- c) Colocar el segmento del catéter sobre la superficie del agar sangre de carnero.
- d) Rodar la porción del catéter a través de la placa, cuatro veces mientras se ejerce presión hacia abajo con la pinza.
- e) Incubar la placa a 35 - 37° C por 24 horas.

#### 5.3.5 Lectura

Realizar el recuento de colonias.  
 Positivo: Recuentos mayores de 15 UFC.  
 Negativo: Recuentos menores o iguales a 15 UFC

#### 5.3.6 Referencias





- OPS. Vol IV *Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias*. Serie HSP/ Manuales Operativos Paltex. N°13, USA. 1996.
- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 64 – 104.

## 5.4 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HERIDA OPERATORIA

### 5.4.1 Objetivo

Describir los procedimientos de cultivo de muestra de herida para el diagnóstico bacteriológico en infecciones de herida abierta y abscesos.

### 5.4.2 Campo de aplicación

Se aplica para el cultivo de muestra de herida para el diagnóstico bacteriológico en infecciones de herida abierta y abscesos.

### 5.4.3 Materiales y Equipos

- a) Estufa de 35 – 37° C.
- b) Cabina de Flujo laminar o mechero Bunsen.
- c) Guantes de látex.
- d) Contenedor de material contaminado.
- e) Medios de cultivo.
  - Agar sangre de carnero – Agar Mc Conkey
  - Pueden incluirse otros medios (ejm. Manitol salado, agar Columbia CNA con 5% de sangre de carnero, etc.)

### 5.4.4 Procedimiento

- a) Realizar los cultivos en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero Bunsen.
- b) Utilizar placas con medios de cultivo cuando éstas hayan alcanzado la temperatura ambiente.
- c) Inoculación de la muestra:
  - Muestra de aspirado purulento: Con una pipeta pasteur inocular una gota de la muestra en un extremo de la superficie de la placa de agar sangre de carnero, agar Mc Conkey y/o otros medios.
  - Hisopado de secreción: Frotar rotando el hisopo sobre la superficie de los medios de cultivo tratando que toda su superficie haga contacto con el agar, empezando con el agar sangre de carnero, Mc Conkey y/o otros medios.
- d) Esterilizar el asa de siembra en el mechero de Bunsen hasta que se ponga rojo vivo.
- e) Dejar enfriar el asa contando hasta 20.
- f) Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la



R. RAMOS M



A. RÓJAS



K. DALVIZ C.



A. CORDERO H.



placa, con el propósito de obtener colonias aisladas (Véase Figura 8).

- g) Incubar las placas de AS a 35° C por 24 horas y el agar McC en condiciones aeróbicas y por 24 horas.
- h) Esterilizar el asa de siembra en el mechero.
- i) Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- j) Incubar las placas a 35 – 37° C por 24 - 48 horas en condiciones aeróbicas.

#### 5.4.5 Lectura

A las 24 horas observar el crecimiento de colonias. Si no se observa crecimiento seguir incubando hasta las 48 horas.

#### 5.4.6 Referencia

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 3a ed. 1992, Buenos Aires.

### 5.5 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

#### 5.5.1 Objetivo

Describir los procedimientos de cultivos de muestra de tracto respiratorio inferior: aspirado transtraqueal, lavado y cepillado broncoalveolar.

#### 5.5.2 Campo de aplicación

Se aplica para el cultivo de muestra del tracto respiratorio inferior: aspirado transtraqueal, lavado y cepillado broncoalveolar para el diagnóstico en laboratorio de infecciones del tracto respiratorio inferior.

#### 5.5.3 Condiciones generales

Las muestras del tracto respiratorio inferior se deben enviar inmediatamente al laboratorio, de ocurrir algún retraso, la muestra puede mantenerse refrigerada a 4° C.

#### 5.5.4 Cultivo de Aspirado transtraqueal:

##### a) Materiales y Equipos

Estufa de 35 – 37° C  
Mechero Bunsen o Cabina de Flujo laminar  
Guantes de látex  
Mascarilla

Contenedor de material contaminado

##### Medios de cultivo:

- Agar sangre de carnero (AS) – Agar Mc





Conkey (McC)

- Pueden incluirse otros medios (ejm. Manitol salado, agar cetrimide, etc.)

#### 5.5.4.2 Procedimiento

**Cultivo:**

- Seleccionar la porción de la muestra más purulenta o que contenga sangre.
- Utilizando un hisopo estéril o una pipeta pasteur inocular la muestra en un extremo de la superficie de las placas con los medios de cultivo.
- Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa, con el propósito de obtener colonias aisladas (Véase Figura 6).
- Incubar las placas con los medios de cultivo a 35 – 37° C por 24 a 48 horas.
- Si no hay crecimiento a las 24 horas seguir incubando hasta por 48 horas.

**Frotis:**

- Seleccionar la porción más purulenta de la muestra que contenga sangre.
- Suavemente extenderla en la lámina portaobjetos.
- Dejar secar el frotis al aire, de preferencia dentro de una cabina de flujo laminar.
- Fijar con metanol y colorearlo por Gram.
- Usar bajo aumento (10x) para examinar el frotis y la determinación de polimorfo nucleares y células escamosas.

**Lectura a las 24 horas**

Si no hubiera crecimiento incubar por 24 horas más.

#### 5.5.5 Cultivos cuantitativos: Muestra de cepillado bronquial, y lavado broncoalveolar

Se recomienda que el fluido de lavado broncoalveolar y cepillado bronquial de pacientes con posible neumonía asociada a ventilador mecánico se cultiven cuantitativamente para evaluar en forma óptima la significancia del organismo recuperado.

##### 5.5.5.1 Muestra de Cepillado Bronquial

Una muestra de cepillado bronquial contiene aproximadamente 0,01 mL a 0,001 mL de secreción. Esta se coloca en 1 mL de suero fisiológico o caldo TSB o BHI y se transporta inmediatamente al laboratorio.

**Materiales y Equipos**

- Asa calibrada de platino o descartable de 0.01 mL o tip estéril (10 - 100ul) y micro pipeta
- Estufa de 35 – 37° C
- Mechero Bunsen o Cabina de flujo laminar
- Guantes de látex
- Mascarilla

Contenedor de material contaminado



26





#### Medios de cultivo:

- Agar sangre de carnero (AS) – Agar McConkey (McC)
- Pueden incluirse otros medios (ejm. Manitol salado, agar cetrimide, etc.)

#### Procedimiento

#### Cultivo:

- a) Homogenizar en un córtex.
- b) Tomar 0,01 mL de la muestra utilizando un asa calibrada o una micro pipeta con tip estéril, sembrar en las placas con los medios de cultivo de acuerdo al método descrito en el punto 5.1.4 - g,h.
- c) Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- d) Incubar las placas con los medios a 35 – 37° C por 24 - 48 horas.

#### Lectura a las 24 horas

Si hubiera crecimiento, realizar el recuento de colonias, si no, incubar por 24 horas más.

#### Interpretación

Un recuento de más de 1000 UFC / mL de caldo o suero fisiológico (correspondientes a  $10^6$  UFC / mL de la muestra original) puede correlacionarse con infección.

#### Frotis:

- a) Inmediatamente después de la siembra, centrifugar la muestra restante.
- b) Hacer un frotis del sedimento según los procedimientos señalados en el ítem 5.5.4.2.
- c) Colorear por el método de Gram y realizar la lectura.

#### 5.5.5.2 Muestra de Lavado Broncoalveolar

Durante el lavado broncoalveolar se puede colectar hasta 100 mL de fluido. Una porción de esta muestra es transportada al laboratorio.

#### Materiales y Equipos

- a) Asa calibrada de platino o descartable de 0.001 mL ó 0.01 o tip estéril (10 – 100ul) y micro pipeta.
- b) Estufa de 35 – 37° C.
- c) Mechero Bunsen o Cabina de flujo laminar.
- d) Guantes de látex.
- e) Contenedor de material contaminado.
- f) Mascarilla.

#### Medios de cultivo:





- Agar sangre de carnero (AS) – Agar Mc Conkey (McC)
- Pueden incluirse otros medios (ejm. Manitol salado, agar cetrimide etc.)

#### Procedimiento

##### Cultivo:

- Tomar una alícuota de 0,001 mL ó 0.01 mL con una asa calibrada o una micro pipeta con tips estériles sembrar en los medios de cultivo. Proceder de la misma manera como fue descrita para el cultivo de orina.
- Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- Incubar las placas a 35 – 37° C por 24 - 48 horas.

##### Lectura a las 24 horas

Si hubiera crecimiento bacteriano, realizar el recuento de colonias; si no hubiera crecimiento, incubar por 24 horas más.

##### Interpretación

La recuperación de mayor o igual a 10,000 UFC de un organismo específico por mL de fluido se correlaciona con neumonía.

##### Frotis:

- Inmediatamente después de sembrar la muestra, centrifugar la muestra restante y decantar el sobrenadante.
- Hacer un frotis del sedimento.
- Colorear por el método de Gram y realizar la lectura.

##### Interpretación

- El reporte de coloración Gram debe incluir una observación referente a la presencia o ausencia de organismos intracelulares.
- La observación de más del 7% de células conteniendo organismos intracelulares se correlaciona con neumonía asociada a ventilador mecánico.

#### 5.5.6 Referencias

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 3a ed. 1992, Buenos Aires.

Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 64 – 104.





## 5.6 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA EN CASOS DE ENDOMETRITIS

### 5.6.1 Objetivo

Describir la técnica de siembra primaria de muestras de casos de endometritis por bacterias aerobias.

### 5.6.2 Campo de Aplicación

Se aplica en el cultivo de muestra para el diagnóstico de casos de endometritis debido a bacterias aerobias.

### 5.6.3 Materiales y equipos

- Estufa de 35 - 37° C.
- Cabina de Flujo laminar o mechero Bunsen.
- Guantes de látex.
- Contenedor para material contaminado.

#### Medios de Cultivo

- Agar sangre de carnero (AS).
- Agar Mc Conkey.
- Se puede incluir otros medios (ejm. manitol salado).

### 5.6.4 Procedimiento

- Realizar los cultivos en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero Bunsen.
- Utilizar Las placas con medios de cultivo que hayan alcanzado la temperatura ambiente.
- Inoculación de la muestra:
  - Inocular una gota de la muestra (utilizando una pipeta pasteur) en un extremo de la superficie de la placa de agar sangre de carnero, agar Mc Conkey y/o otros medios
  - Hisopado de secreción: Frotar rotando el hisopo sobre la superficie de los medios de cultivo tratando que toda su superficie haga contacto con el agar empezando con el agar sangre de carnero, Mc Conkey y/o otros medios.
- Esterilizar el asa de siembra en el mechero de Bunsen hasta que se ponga rojo vivo.
- Dejar enfriar el asa contando hasta 20.
- Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa, con el propósito de obtener colonias aisladas (Véase Figura 6).
- Incubar las placas a 35 – 37° C por 24 horas.
- Esterilizar el asa de siembra en el mechero.
- Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- Incubar las placas a 35 – 37° C por 24 - 48 horas en condiciones aeróbicas.

### 5.6.5 Lectura



29





A las 24 horas observar el crecimiento de colonias. Si no se observa crecimiento seguir incubando hasta por 48 horas.

Si se ha seguido correctamente los procedimientos de una buena obtención y conservación de la muestra, el aislamiento de una colonia es significativo.

## SECCION 6

### IDENTIFICACION BACTERIANA

Para un adecuado sistema de vigilancia de las infecciones intrahospitalarias es necesario realizar la identificación de casos y su etiología, la determinación de las características epidemiológicas, aplicar medidas de control y una continua supervisión para determinar el éxito de esas medidas. El laboratorio de microbiología tiene responsabilidades importantes relacionadas a cada paso de este proceso, pero tal vez su rol más relevante es la identificación del microorganismo causante de una infección, más aún cuando el espectro de los agentes responsables de infecciones intrahospitalarias han cambiado en los últimos años.

Esta sección describe los protocolos básicos de trabajo recomendados para la identificación de las bacterias involucradas en el sistema de la vigilancia de infecciones intrahospitalarias. Si bien es cierto que el desarrollo de sistemas de multipuebas, pruebas bioquímicas rápidas y pruebas enzimáticas nos brindan facilidades en la identificación de las bacterias, su uso no está al alcance de todos los laboratorios, debido a ello se describen protocolos de trabajo con pruebas bioquímicas convencionales para la identificación de bacterias.

En la identificación bacteriana es necesario considerar las características macroscópicas de las colonias teniendo en cuenta el medio de aislamiento original y sus características microscópicas para poder elegir las pruebas diferenciales correspondientes.

Se deben mantener las medidas de bioseguridad en el manejo de reactivos y cultivos, siguiendo los procedimientos descritos en la SECCION 2 de Normas de Bioseguridad. Serie de Normas técnicas N° 18.

#### 6.1 IDENTIFICACION BACTERIANA DE COCOS GRAM POSITIVOS: *Staphylococcus* y *Enterococcus*

##### 6.1.1 Objetivo

Describir los procedimientos para la identificación de Cocos Gram positivos: *Staphylococcus* y *Enterococcus* aisladas a partir de muestras clínicas.

##### 6.1.2 Campo de aplicación

Esta parte comprende la identificación de Cocos Gram positivos: *Staphylococcus* y *Enterococcus*







### 6.1.3 Condiciones generales

- a) La primera consideración práctica a tomar en cuenta es determinar, si un aislamiento es estafilococo, estreptococo o entero coco. Esta diferenciación se realiza en base a la morfología de la colonia, tipo de hemólisis, forma de las bacterias por coloración Gram a partir de un cultivo y de la prueba de reacción de la catalasa.
- b) Las colonias de estafilococos son comúnmente grandes (2 mm a 3 mm a las 24 horas), convexas, lisas, enteras, opacas y con frecuencia pigmentadas, a diferencia de las colonias
  - No es necesario mezclar el cultivo con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
  - Observar una inmediata efervescencia (formación de burbujas) lo que indica una prueba positiva, de lo contrario se considera la prueba negativa.
  - Desechar el portaobjetos colocándolo en un desinfectante
  - Realizar este procedimiento en forma paralela con cepas controles:
    - Control positivo : *S. aureus*.
    - Control negativo: *Streptococcus spp*

**NOTA:** Al coger la colonia con el asa de siembra tener cuidado de no llevar algo del medio de agar sangre debido a que la catalasa presente en los eritrocitos, puede dar resultados falsos positivos.

No invertir el orden del método porque pueden producirse resultados de falsos positivos.

Si son catalasa positivas primeramente determinar si el organismo es o no *Staphylococcus aureus*, para ello se realiza la prueba de la coagulasa.

#### d) Prueba de la coagulasa

- Se realiza para comprobar la facultad de la bacteria de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa, la cual aumenta la velocidad de coagulación del plasma. El resultado final es la formación de un coágulo de fibrina.
  - Prueba en lámina (detecta factor de aglutinación o coagulasa ligada).
  - Prueba en tubo (detecta coagulasa libre y ligada).
- La prueba de coagulasa en tubo es definitiva, y la prueba de coagulasa en lámina puede ser usada como una técnica de tamizaje rápida para la identificación de *S. aureus*. Todas las pruebas negativas en lámina deben repetirse utilizando la técnica entubo.

#### Reactivo

Plasma de conejo deshidratado. (Reconstituir de acuerdo a las instrucciones del fabricante).

**NOTA:** El plasma humano no debe ser usado a menos que haya sido





cuidadosamente probado de no contener algún agente infeccioso, capacidad de coagulación e inhibidores.

#### Controles:

Positivo : *S. aureus*

Negativo: *S. epidermidis* o *S. Saprophyticus*

#### Prueba en Lámina

La prueba de la coagulasa en lámina es un método únicamente presuntivo. Por esa razón todos los resultados negativos o retardados (más de 20 segundos) deben ser confirmados por la prueba en tubo.

#### Procedimiento

- Preparar una suspensión densa de la colonia en agua destilada o solución fisiológica mezclando bien para homogenizar.
- Si hubiera autoaglutinación no continuar y realizar la prueba en tubo.
- Agregar una gota de plasma y mezclar con movimientos circulares.
- Observar la formación de aglutinación o precipitado dentro de 20 segundos.
- Todas las pruebas negativas y positivas retardadas (20 a 60 segundos) debe confirmarse con la prueba en tubo.

**NOTA:** Es una prueba bastante rápida y económica pero del 10 a 15 % de *S. aureus* pueden dar un resultado negativo, por eso, todos los resultados negativos deben repetirse utilizando la técnica en tubo.

#### Prueba en Tubo

#### Procedimiento

- Transferir una colonia aislada del agar sangre de carnero a 0,5 mL de plasma reconstituido (en un tubo de vidrio estéril de 13 x 100).
- Girar el tubo suavemente para lograr la suspensión del organismo. No agitar.
- Incubar la mezcla a 35 – 37° C (en baño maría de preferencia) por 4 horas; observar si hay formación de coagulo inclinando lentamente el tubo.
- Observar cuidadosamente si hay formación de coagulo inclinando lentamente el tubo (sin agitar) en intervalos hasta 4 horas. Cualquier grado de coagulación es una prueba positiva.
- La mayoría de los *S. aureus* formarán coagulo dentro de una hora.
- Si es negativa a las 4 horas seguir incubando hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Esto es recomendado porque un pequeño número de cepas de *S. aureus* pueden requerir más de cuatro horas para la formación del coágulo. Considerar que *Staphylococcus* produce fibrinolisisina, la cual puede lisar el coagulo.
- Realizar el control de calidad del reactivo utilizando controles positivos y negativos. Si es coagulasa positiva se identifica como *Staphylococcus aureus*.
- Si son estafilococos coagulasa negativos, realizar las pruebas de resistencia a la





polimixina B y novobiocina (disco de 5ug) para tener una identificación presuntiva. *S.saprophyticus* es resistente a la novobiocina y *S. epidermidis* es resistente a la polimixina B.

**NOTA:** Es preferible utilizar baño maría para esta prueba (Foto N° 3).

#### e) Resistencia a la novobiocina

Esta prueba se realiza principalmente para distinguir *S. saprophyticus* de otras especies de importancia clínica.

#### Medios y Reactivos

- TSA con sangre de carnero o Agar Mueller Hinton
- Suero fisiológico o Caldo tripticasa soya  
Discos de novobiocina (5 µg por disco)
- Escala 0.5 de Mc Farland
- Incubadora a 35 – 37° C
- Vernier o regla

#### Procedimiento

- A partir de colonias aisladas y cultivadas por 24 horas hacer una suspensión equivalente a la escala 0.5 de Mc Farland.
- Sumergir un hisopo estéril dentro de la suspensión ajustada y rotarlo varias veces presionando sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido. Esto removerá el exceso de inóculo del hisopo.
- Inocular sobre la superficie seca de una placa con agar sangre de carnero estriando homogéneamente con el hisopo sobre la superficie del agar. Repetir el procedimiento dos veces más rotando la placa 90°.
- Dejar de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.
- Colocar el disco de novobiocina y presionar suavemente con una pinza estéril
- Incubar a 35 – 37° C toda la noche o 24 horas.

#### Lectura

Medir el halo de inhibición. Un halo  $\leq 16$  mm es resistente a la novobiocina, si es mayor es sensible.

La resistencia a novobiocina es intrínseca en *S. saprophyticus*

#### f) Resistencia a la polimixina B

#### Medios y Reactivos

- TSA con sangre de carnero.
- Suero fisiológico o Caldo tripticasa soya
- Discos de polimixina B (300 U por disco)
- Escala 0,5 de Mc Farland





- Vernier o regla

**Procedimiento**

Realizar el mismo procedimiento descrito para detectar la resistencia a novobiocina. Ambas pruebas pueden realizarse en la misma placa.

**Lectura**

La resistencia a la polimixina B se define por una zona de inhibición menor de 10 mm. *S. aureus* y *S. epidermidis* son usualmente resistentes.

**6.1.4.2 Resultados:**

Comparar los resultados con la tabla N° 1 que muestra las principales características de *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos comúnmente asociados a infecciones.

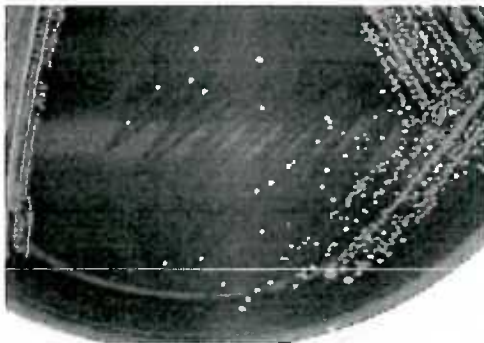


Foto N° 1

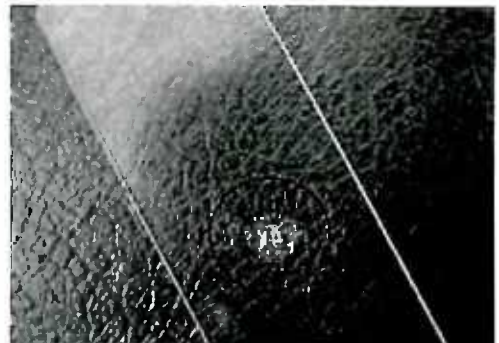


Foto N° 2

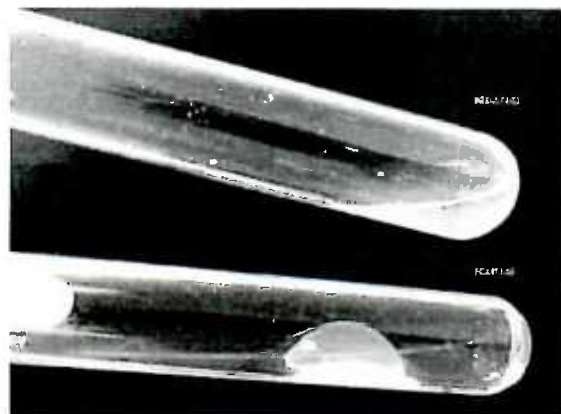


Foto N° 3

Foto N° 1: Colonias de *Staphylococcus aureus* en agar sangre

Foto N° 2: Prueba de catalasa





Foto N°3: Prueba de coagulasa en tubo

### 6.1.5 Identificación de entero cocos:

Los entero cocos pueden presentarse como células únicas, en pares o en cadenas cortas. Se ven de forma cocobacilar cuando la coloración de Gram se realiza de una placa de agar y pueden verse en cadenas cuando se prepara la coloración de Gram a partir de caldo thioglicolato. Son anaerobios facultativos y su crecimiento óptimo es a 35° C. Muchas cepas crecen a 10 y 45° C.

#### 6.1.5.1 Lectura de cultivos en Agar sangre de carnero y Agar Columbia CNA

##### a) Apariencia de las colonias

Usualmente son alfa hemolíticas o no hemolíticas en agar sangre de carnero 5% aunque también puede haber especies beta hemolíticas como algunas cepas de *E. durans*.

(Foto N° 4)

##### b) Coloración Gram

Si se observan cocos Gram positivos y se presentan solos, en pares o en cadenas cortas, algunas veces cocobacilares, realizar la prueba de la optoquina. Aplicar el procedimiento descrito en el anexo B, Método de coloración de Gram.

##### c) Prueba de la catalasa

Seguir los procedimientos descritos en la identificación de *Staphylococcus*. *Enterococcus* es catalasa negativo.

**Nota:** Algunas veces se produce una pseudo catalasa y se puede observar una débil efervescencia. Esto ocurre cuando *E. faecalis* desarrolla en medios que contienen sangre, (2) en este caso subcultivar la colonia en estudio en TSA o agar Mueller Hinton y repetir la prueba.

##### d) Prueba de la esculina en medio con bilis

Para determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculina y glucosa, en presencia de bilis (Foto N° 5).

##### Procedimiento

- Inocular el cultivo en estudio haciendo estrías sobre la superficie del pico de flauta o de la placa de agar bilis esculina.
- Incubar a 35 – 37° C hasta 72 horas.
- Se puede controlar periódicamente, y esperar hasta las 72 horas antes de informar como negativo.

##### Lectura:





Positivo: En tubo: Ennegrecimiento difuso en el agar inclinado

En placa: Se observa un halo negro o marrón alrededor de las colonias en la placa. Negativo: No se produce ennegrecimiento del medio o ennegrecimiento de menos de la mitad del tubo después de 72 horas de incubación.

#### Controles

- Control negativo: *Staphylococcus aureus*
- Control positivo: *Enterococcus spp*

#### e) Tolerancia al cloruro de sodio

Para determinar la facultad de un organismo de desarrollar en presencia de una concentración de 6.5 % de cloruro de sodio.

#### Procedimiento

- Inocular en el caldo TSB con cloruro de sodio un cultivo de 18 - 24 horas de incubación.
- Incubar a 35 - 37° C por 24 horas.
- Se puede controlar periódicamente, y esperar hasta las 72 horas antes de informar como negativo

#### Lectura:

- Positivo: Hay desarrollo bacteriano  
Negativo: No se observa crecimiento en el caldo

#### Controles

- Control negativo: *Escherichia coli*
- Control positivo: *Staphylococcus aureus*

6.1.5.2 Observar el oscurecimiento del agar indicando si hubo hidrólisis de la esculina y el crecimiento en el caldo con cloruro de sodio. Con estas pruebas tenemos dos identificaciones presuntivas posibles:

Casi todos los entero cocos (95%) son esculina positivos y crecen en medios con 6.5% de cloruro de sodio produciendo acidez.

5% - 10% de *Streptococcus* del grupo viridans son bilis esculina positivos.

NOTA: Una vez que se ha establecido que el microorganismo en estudio es presuntivamente un *Enterococcus* o un género cercano a él (*Lactococcus* o *Vagococcus*) se puede hacer la identificación de las especies de acuerdo a la Tabla N° 2.

*Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Vagococcus* han sido aislados de infecciones humanas.





a) **Crecimiento en telurito de potasio**

Es útil para la identificación presuntiva de *E. faecalis* (Foto N° 6).

**Procedimiento:**

- a) Sembrar la cepa en estudio en TSA con 0.04% de telurito de potasio.
- b) Incubar a 35 – 37° C. Si hay desarrollo de colonias negras se identifica presuntivamente como *E. faecalis*.

**6.1.5.3** Sembrar en caldo para fermentación de carbohidratos con manitol, sorbosa, rafinosa, sorbitol y arabinosa, y en caldo base descarboxilasa con arginina.

a) **Metabolismo de carbohidratos**

**Procedimiento**

- a) A-partir de un cultivo puro de 24 horas inocular los caldos conteniendo los diferentes carbohidratos con las colonias sospechosas cultivos puros.
- b) Incubar a 35 – 37° C hasta por 4 días.

**Lectura**

- a) Positivo: Viraje de color hacia el amarillo (indicador púrpura de bromocresol), indica producción de acidez .
- b) Negativo: No hay viraje de color.

b) **Descarboxilación de la arginina**

Seguir los pasos descritos en el procedimiento: Producción de descarboxilasas en  
**IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES:**  
*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter* (Foto N° 7)

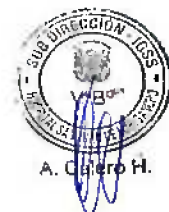




Foto N° 4

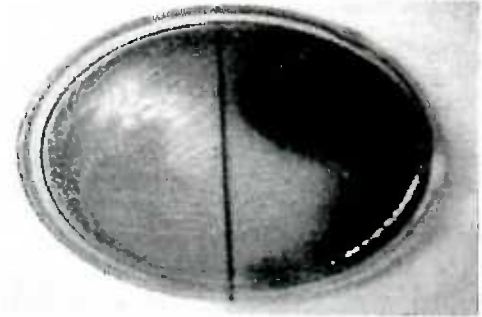


Foto N° 5



Foto N° 6

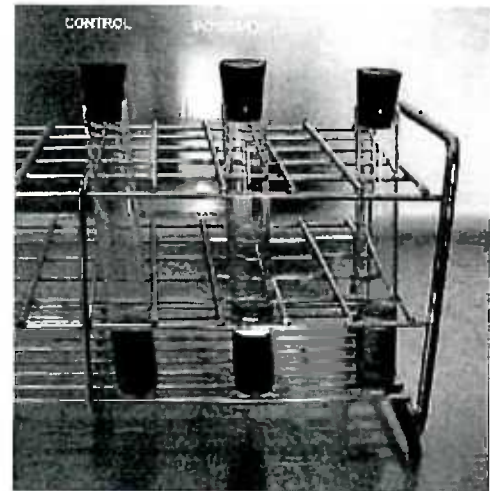


Foto N° 7

Foto N°4: Colonias de *Enterococcus faecalis* en agar sangre

Foto N°5: Hidrólisis de la esculina en medio bilis esculina

Foto N°6: Desarrollo de *E. faecalis* en agar telurito de potasio 0.04%

Foto N°7: Descarboxilación de la arginina en medio de Moeller

## 6.2 IDENTIFICACION DE BACIOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter*

### 6.2.1 Objetivo

Describir los procedimientos de cultivos e identificación de bacilos Gram negativos







fermentadores: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter*.

### 6.2.2 Campo de aplicación

Comprende el cultivo e identificación por pruebas bioquímicas de las colonias desarrolladas en agar Mc Conkey de las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Entero-bacter*

### 6.2.3 Condiciones generales

Las bacterias Gram negativas fermentadoras se desarrollan en agar sangre de carnero y agar Mc Conkey, pero en agar sangre de carnero no podemos hacer mayor diferenciación entre las colonias, sin embargo, en el agar Mc Conkey podemos diferenciar las colonias lactosa positivas y lactosa negativas.

### 6.2.4 Lectura de cultivos en Agar Mac Conkey

- En agar Mc Conkey, *Escherichia coli* lactosa positiva son colonias de borde entero, de color fucsia, opaco, de 2 mm - 3 mm de diámetro, usualmente rodeadas de una zona opaca alrede-dor de la colonia (bilis precipitada). Las cepas de *E. coli* que son lactosa negativas dan colonias incoloras de 3 - 4 mm.  
(Foto N° 8)
- En agar Mc Conkey, *K. pneumoniae* son colonias de borde entero, de color rosado a rosado oscuro, de 3 - 4 mm de diámetro y mucoides.  
(Foto N° 9)
- En agar Mc Conkey *Enterobacter spp.* son colonias de borde entero, de color rosado de 2 - 4 mm de diámetro, no tan mucoides como *K. Pneumonia*.  
(Foto N° 10)

Las colonias con estas características son subcultivadas en medios diferenciales.

### 6.2.5 Pruebas bioquímicas

- Utilización de lactosa
- Utilización de glucosa
- Producción de gas de glucosa
- Descarboxilación de lisina
- Producción de ácido sulfhídrico
- Utilización del citrato
- Producción de ureasa
- Prueba MR
- Prueba VP
- Motilidad
- Producción de indol
- Prueba de ONPG

#### 6.2.5.1 Procedimiento

- Identificar la colonia sospechosa que se encuentra en la placa de agar Mc Conkey.
- Esterilizar al rojo vivo el asa de siembra recta en un mechero de Bunsen.





- c) Enfriar el asa.
- d) Obtener la colonia seleccionada con el asa recta, tratando de no tocar el fondo del medio de cultivo ni otra colonia vecina.
- e) Sembrar por estría en los medios diferenciales empezando por el agar citrato, urea (en la superficie) , TSI, LIA (introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, retirar por el mismo trazo y sembrar en estría la parte inclinada), caldo para la prueba de indol, MRVP.
- f) Sembrar por puntura en el centro del agar movilidad hasta una profundidad aproximada de 1.5 cm.
- g) Incubar a 35 – 37° C de 18 a 24 horas.

### 6.2.5.2 Lecturas

#### a) Agar TSI

En estos medios se determina la capacidad de la bacteria de utilizar la lactosa, glucosa y sacarosa (en TSI), con producción o no de gas y la producción de ácido sulfhídrico.

#### Lectura

Es importante hacer la lectura entre las 18 - 24 horas para no obtener resultados erróneos. La lectura se hace sobre la base de tres características: Utilización de hidratos de carbono, producción de gas y producción de ácido sulfhídrico.

- Utilización de hidratos de carbono:
  - Utilización de lactosa: Reacción ácida en el pico de flauta (color amarillo) Abreviatura: (A).
  - Utilización de glucosa: Reacción ácida en la columna del medio (color amarillo) Abreviatura: (A).
  - No hay utilización del carbohidrato: Se puede observar una reacción alcalina (color rojo) o que no hay cambio de color (permanece del mismo color que el medio no inoculado) Abreviaturas: (K) o (N) respectivamente.

**NOTA:** Cuando el microorganismo también produce  $H_2S$  el precipitado negro puede ocultar la acidez.

- Producción de gas de glucosa:
  - Se considera positivo: Presencia de una sola burbuja de gas, burbujas en el medio, división del medio, desplazamiento completo del medio del fondo del tubo dejando un área clara o una ligera muesca del medio en el costado del tubo.
  - Se registra la lectura por medio de cruces (+).
- Producción de ácido sulfhídrico:
  - Se manifiesta por un color negro distribuido por toda la columna del medio de cultivo o sólo en la parte superior .
  - Se registra la lectura por medio de cruces (+)





**c) Utilización de citrato**

Para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para su metabolismo.

**Procedimiento**

- a) Incubar a 35 – 37° C 24 horas - 48 horas. En algunos casos es necesario una incubación hasta por 4 días.
- b) Ver el viraje de color.

**Resultados**

- a) Prueba positiva: Crecimiento con un color azul intenso en el pico de flauta, o presencia de colonias en ausencia del color azul.
- b) Prueba negativa: No se observa crecimiento ni cambio de color (verde).

**Controles**

Positivo: *Enterobacter cloacae*  
Negativo: *Escherichia coli*  
(Foto N° 13)

**d) Hidrólisis de la urea (producción de ureasa)**

Es útil para determinar la capacidad de un organismo de degradar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

**Procedimiento**

Realizar la lectura después de 18 horas - 24 horas de incubación observando el viraje de color.

**Resultados**

Prueba positiva: Color rojo rosado intenso en el pico de flauta o todo el agar. Puede haber una reacción positiva retardada después de 24 horas y hasta 6 días de incubación (algunas cepas de *Klebsiella* por ejemplo).  
Prueba negativa: No se produce cambio de color.

**Controles**

Negativo: *Escherichia coli*  
Positivo: *Klebsiella pneumoniae*  
(Foto N° 14)

**e) Rojo de metilo**





Permite comprobar la capacidad del microorganismo para producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa determinando cualitativamente el pH del medio.

**Procedimiento**

El caldo debe ser incubado a 35 – 37° C durante 48 a 72 horas.  
 Asépticamente retirar 2,5 mL de caldo a un tubo estéril.  
 Añadir directamente al caldo 5 gotas del reactivo rojo de metilo (indicador de pH)  
 Interpretar el resultado del viraje de color inmediatamente  
 Si la lectura fuera negativa continuar la incubación para repetir la prueba

**NOTA:** No debe realizarse la lectura antes de las 48 h de incubación para evitar resultados erróneos.

El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4,4 y es una prueba positiva. Un color naranja (pH 5 a 5,8) indica una prueba negativa.

**Resultados**

Prueba positiva: Color rojo  
 Prueba negativa: Color amarillo o naranja.

**Controles**

Control positivo: *Escherichia coli*  
 Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*  
 (Foto N° 15)

**f) Voges Proskauer**

Es útil para determinar la capacidad de algunos microorganismos de degradar la glucosa hasta acetilmetilcarbinol (acetoina) a través de un proceso de fermentación.

**Medios y reactivos**

Medio MR VP cnaftol al 5 % KOH al 40%.

**Procedimiento**

Incubar por 24 - 48 horas a 35 – 37° C.  
 Transferir 1 mL de caldo a un tubo de ensayo limpio. Añadir con una pipeta pasteur 0,6 mL de cnaftol al 5 % y 0,2 mL de KOH al 40%.  
 Agitar el tubo cuidadosamente (para exponerlo al oxígeno atmosférico) y dejarlo reposar durante 10 a 15 minutos.

**Resultados**

Prueba positiva: Desarrollo de un color rojo - rosado en la superficie del medio. Prueba negativa: Mantiene su color





### Controles

Control positivo: *Klebsiella pneumoniae*

Control negativo:

*Escherichia coli* (Foto N° 16)

### g) Motilidad (Medios SIM, o MIO o agar movilidad)

Para determinar si un organismo es móvil o inmóvil.

### Procedimiento

Incubar a 35 – 37° C durante 24 a 48 horas.

### Resultados

**Positivo:** Los microorganismos migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbidez. También puede manifestarse semejando "vellosidades" a lo largo del trazo de siembra.

**Negativo:** Se observa un crecimiento bacteriano acentuado siguiendo el trazo de siembra, y el medio circundante se mantiene claro.

### Controles

### Procedimiento

- Retirar asépticamente 2 mL de caldo de cultivo con 24 horas de incubación.
- Agregar 5 gotas de reactivo de Kovacs.
- Mover suavemente el tubo y realizar la lectura.
- Evaluar el cultivo a las 24 horas si la lectura es negativa, deberá incubarse otras 24 horas. El cultivo restante y repetirse la prueba.

### Resultados

Prueba positiva: Formación de un anillo rojo en la superficie del medio (la capa alcohólica) Prueba negativa: No se produce color en la capa alcohólica, y toma el color del reactivo empleado

### Controles

Control positivo: *Escherichia coli*

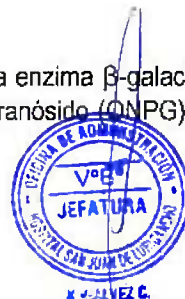
Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*  
(Foto N° 18)

### i) Prueba de la $\beta$ galactosidasa (ONPG)

Es útil para demostrar la presencia o ausencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa utilizando el compuesto orgánico o - nitrofenil -  $\beta$ -D galactopiranosido (ONPG) y para diferenciar



43





los organismos con reacción retardada a la lactosa de los organismos lactosa negativos.

#### Reactivo

Discos o tabletas de ONPG.

#### Procedimiento

Seguir las instrucciones del fabricante.

#### Resultados

Prueba positiva: Formación de un color amarillo (formación de ortonitrofenol a partir del ONPG).

Prueba negativa: No hay cambio de color.

#### Controles

Control positivo:

*Escherichia coli* Control

negativo: *Proteus spp*

#### NOTA 1:

- Todas las *Escherichia coli* producen acidez de glucosa en el TSI o KIA (5% no producen gas) y un 98% son indol positivo, VP -, MR+ (99%), móviles (95%)
- Todas las *Klebsiella pneumoniae* son Indol negativo, ornitina descarboxilasa negativa, no móviles. VP + (98%), citrato + (98%), urea +(95%), lisina descarboxilasa (98%), gas de glucosa (97%).

**NOTA 2:** Si se dispone de los medios y reactivos adicionalmente se pueden realizar pruebas de producción de descarboxilasas como:

- Descarboxilación de la ornitina (\*)
- Descarboxilación de arginina

(\*) Si no se dispone del medio MIO.

#### j) Producción de descarboxilasas

Las pruebas de descarboxilación se realizan para medir la capacidad enzimática de un microorganismo para descarboxilar un aminoácido, el que da lugar a una amina, produciendo la alcalinización del medio.

##### Procedimiento

- Inocular el cultivo en dos tubos con caldo descarboxilasa, uno de los cuales deberá contener el aminoácido a estudiar
- Cubrir con aceite mineral los tubos e incubar a 35 - 37° C durante 24 - 48 horas.

##### Lectura



R. RAMOS M



A. ROJAS

44



L. GARCÍA C.



A. Cárdenas



Positivo: Color azul púrpura en el tubo que contiene el aminoácido  
 Negativo: Color amarillo  
 Anotar los resultados de las pruebas de utilización de carbohidratos y producción de descarboxilasas.

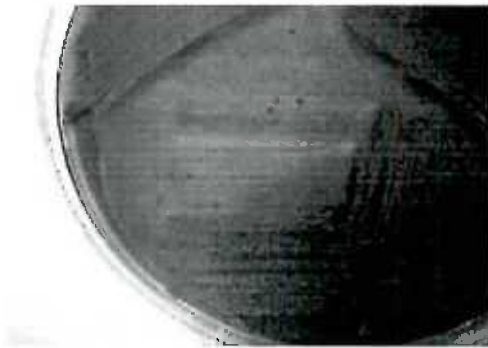


Foto N°8

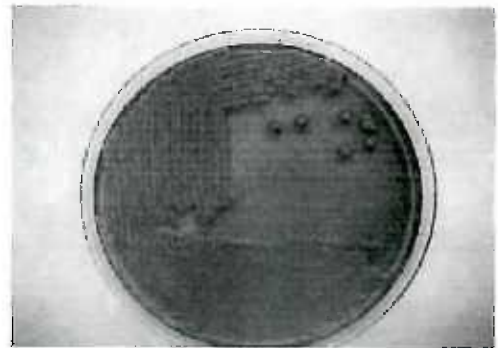


Foto N°9

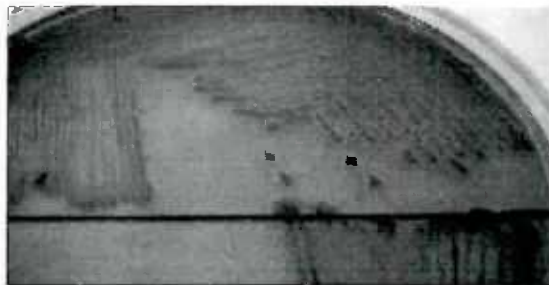


Foto N°10

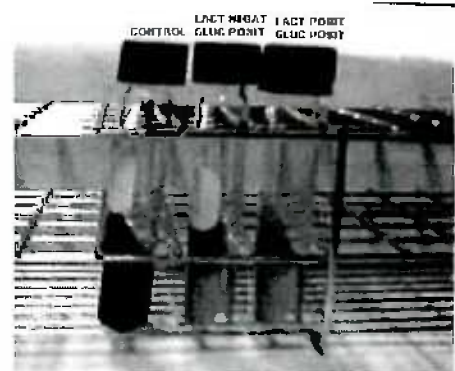
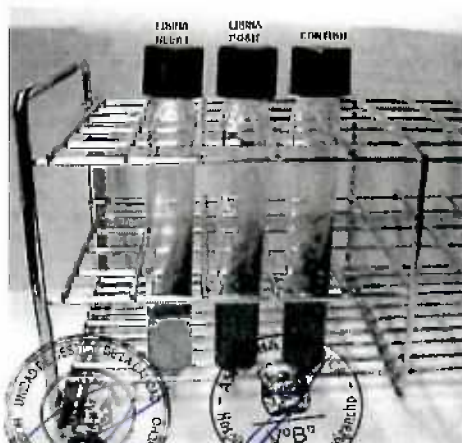


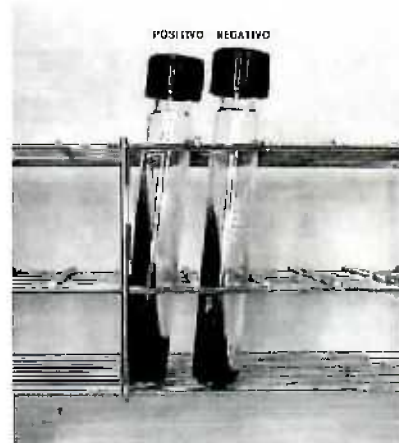
Foto N°11

Foto N°8: Colonias de *Escherichia coli* en agar McConkey  
 Foto N°9: Colonias de *Klebsiella pneumoniae* en agar McConkey  
 Foto N°10: Colonias de *Enterobacter cloacae* en agar McConkey  
 Foto N°11: Reacciones bioquímicas en el agar TSI



R. RAMOS M

A. ROJAS



Galero P



A. ALVEZ C



Foto N°12

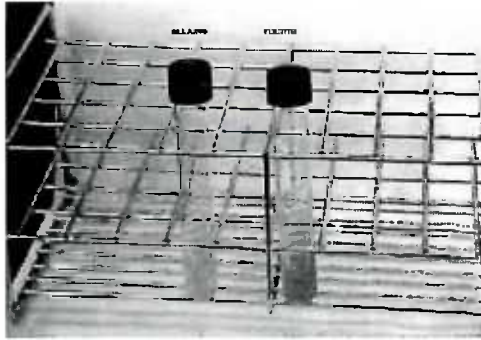


Foto N°13

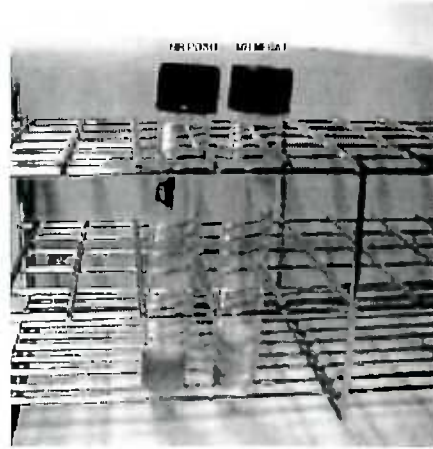


Foto N°14

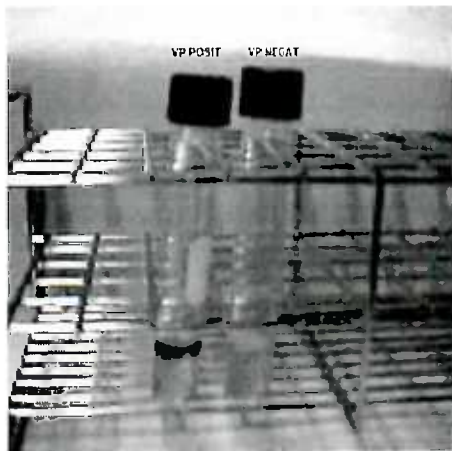
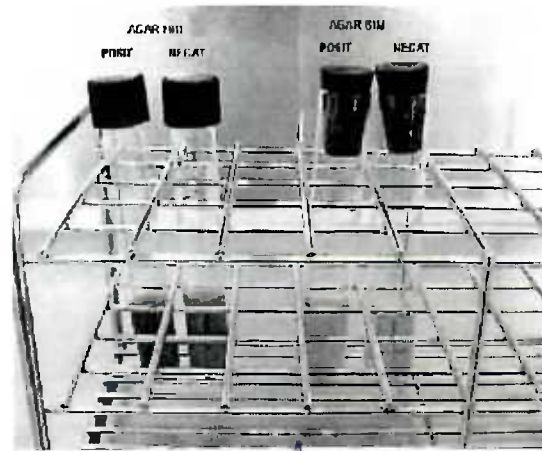


Foto N°15



**Foto N°12:** Reacciones bioquímicas en el agar LIA  
**Foto N°13:** Reacción bioquímicas en el agar citrato.  
**Foto N°14:** Producción de ureasa.  
**Foto N°15:** Prueba del Rojo de metilo.

Foto N°16

Foto N°17





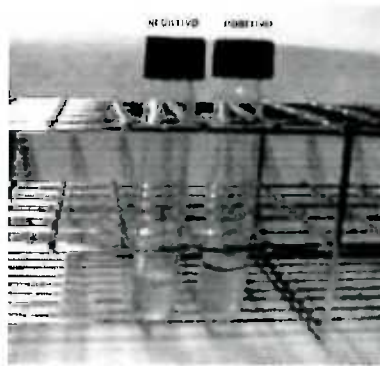


Foto N°18

Foto N°16: Prueba de Voges proskauer.

Foto N°17: Prueba de movilidad.

Foto N°18: Prueba de indol.

### 6.3 IDENTIFICACIÓN DE BACILO GRAM NEGATIVO NO FERMENTADOR:

*Pseudomonasaeruginosa*

#### 6.3.1 Objetivo

Describir los procedimientos de identificación de *Pseudomonas aeruginosa* por medio de pruebas bioquímicas.

#### 6.3.2 Condiciones generales

*Pseudomonas aeruginosa* es fácilmente reconocida en medios de aislamiento primario por sus características:

Morfología de la colonia

Producción de pigmentos difusibles si están presentes Olor característico.

#### 6.3.3 Identificación

##### 6.3.3.1 Morfología de las colonias

Las colonias generalmente son planas, algo extendidas, bordes aserrados y tienen un brillo



A. Castro H.



metálico (Foto N° 19).

NOTA: Algunas cepas de *P. aeruginosa* pueden no producir pigmentos, frecuentemente estas cepas son bastante mucoides y se aíslan a partir de muestras de secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística.

### 6.3.3.2 Determinación de las características bioquímicas

Identificada la colonia sospechosa. Realizar las siguientes pruebas:

- a) Utilización de lactosa
- b) Utilización de glucosa
- c) Prueba de oxidasa
- d) Crecimiento a 42° C
- e) Utilización de citrato
- f) Reducción de nitrato
- g) Hidrólisis de la gelatina

### 6.3.4.3 Procedimiento

- a) Identificar la colonia sospechosa que se encuentra en la placa de agar Mc Conkey.
- b) Esterilizar al rojo vivo el asa de siembra recta en un mechero de Bunsen.
- c) Enfriar el asa.
- d) Obtener la colonia seleccionada con el asa recta, tratando de no tocar el fondo del medio de cultivo ni otra colonia vecina.
- e) Sembrar por estría en los medios diferenciales empezando por el agar citrato (en la superficie), TSI, LIA (introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, retirar por el mismo trazo y sembrar en estría la parte inclinada), caldo para la prueba de indol y caldo nitrato.
- f) Sembrar por puntura en el centro del agar gelatina (hasta una profundidad de 1,5 cm - 2,5 cm) y agar movilidad hasta una profundidad aproximada de 1.5 cm.
- g) o Mueller Hinton (sembrar solo una placa de TSA o Mueller Hinton si no se dispone de incubadora a 42° C).
- h) Utilizando un asa de siembra en aro estéril y tomando como referencia central el inóculo de la colonia, realizar la siembra por dispersión agotamiento en los cuadrantes de la placa.
- i) Incubar a 35 – 37° C de 18 a 24 horas a excepción de una placa de TSA que debe ser incubada a 42° C.

NOTA : De no disponer de estufa a 42° C, una alternativa es utilizar un baño maría graduado a 42° C y sembrar el cultivo en estudio en TSB o BHI e incubarlo de 18 a 24 horas.

### 6.3.4.4 Lecturas

- j) **Agar TSI** Quemar el asa y dejar enfriar.
- a) Con el asa recta obtener la misma colonia trabajada y cogerla tratando de no tocar el fondo del medio de cultivo ni otra colonia vecina y sembrar haciendo pequeños trazos en el extremo de dos placas de TSA



48





Seguir los pasos descritos en el Procedimiento **IDENTIFICACION DE BACILOS GRAMNEGATIVOS FERMENTADORES: *Escherichia coli*, *Enterobacter* *K. pneumoniae*.**

*P. aeruginosa* da una reacción: K/K o N/N y no hay producción de sulfuro de hidrógeno.(Foto N° 20)

**b) Prueba de utilización de citrato Procedimiento**

Seguir los pasos descritos en el Procedimiento **IDENTIFICACION DE BACILOS GRAMNEGATIVOS FERMENTADORES: *Escherichia coli*, *Enterobacter spp* *K. pneumoniae*.**

**NOTA:** 95% de cepas de *P. aeruginosa* son positivos.

**c) Prueba de hidrólisis de la gelatina**

Determina la capacidad de un microorganismo de producir gelatinasas (enzimas de tipo proteolítico) que licúan la gelatina.

**Medio**

Gelatina nutritiva pH 6,8

**Procedimiento**

Utilizando una asa de siembra en punta y a partir de un cultivo puro de 18 a 24 horas coger un inóculo abundante y hacer una punción en el centro y en forma vertical en el medio de gelatina hasta una profundidad de 1.5 a 2.5 cm.  
Utilizar un tubo con medio de gelatina sin inocular como control de la prueba.  
Incubar los cultivos en estudio y de control a 22 - 25° C por 24 - 48 horas y hacer la lectura. Evaluar diariamente el cultivo durante 14 días.

Al término de cada periodo de 24 horas colocar el tubo control y el de estudio en el refrigerador o en un recipiente con hielo durante 2 horas aproximadamente para determinar si se ha producido o no la digestión de la gelatina (licuefacción).  
Realizar las lecturas observando si hay crecimiento (turbidez) y licuefacción.

**Controles**

Positivo : *Serratia marcescens*  
Negativo : *E.coli*

**Resultados**

Positivo : medio de cultivo semilíquido.  
Negativo: medio de





Se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato a nitritos o en nitrógeno libre.

**Medios y reactivos**

Caldo con nitrato: pH 7 Reactivo A (Ver anexo cultivo sólido).

**Recomendaciones**

En todos los ensayos debe prepararse un tubo control (sin inoculación del microorganismo). Pasar los tubos de la incubadora al refrigerador sin agitarlos para evitar resultados falsos negativos (Foto N° 21).

**d) Prueba de reducción de nitrato a nitritos**

- C) Reactivo B (Ver anexo)
- C) Polvo de zinc

**Procedimiento**

Incubar a 35 – 37° C por 12 a 24 horas. Puede requerir una incubación hasta 5 días pero no es frecuente.

Agregar directamente al caldo de cultivo, 1 gota del reactivo A y 1 gota del reactivo B.

**Resultados**

- Primera prueba:
  - Positivo: cambia a un color rojo dentro de 30 - 60 segundos (prueba completa).
  - Negativo: no cambia de color.
- Segunda prueba:
  - Agregar aproximadamente 20 mg de polvo de zinc, y observar el color en el término de 5 - 10 minutos.
  - Positivo: no hay desarrollo de color. El nitrato ha sido reducido a nitrógeno libre. (ausencia de nitrito en el medio).
  - Negativo: color rosado a rojo intenso, el nitrato no fue reducido por el organismo (el zinc redujo el nitrato en nitrito).

**Controles**

Un medio sin inocular (para determinar si hay nitrito en el medio) y un control positivo, ambos tratados en las mismas condiciones que para el tubo con la muestra problema.

Control positivo : *Escherichia coli*

Control negativo: *Acinetobacter calcoaceticus* (Foto N° 22).

**e) Prueba de la oxidasa**

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. Con esta prueba se determina la presencia de la enzima oxidasa.





### Reactivos

N,N,N,N, tetrametil-p fenilenediamina o  
N,N, dimetil-p fenilenediamina Solución acuosa al 1%

### Procedimiento

Se trabaja a partir del crecimiento bacteriano en TSA o Mueller Hinton. Humedecer un trozo de papel de filtro con el reactivo dentro de una placa petri.  
Con la ayuda de un mondadiente o un asa de platino o aluminio (el nicrón u otro material de las asas que contienen hierro pueden causar reacciones falsas positivas) se coge la colonia a probar y se coloca extendiéndola sobre el papel filtro.

### Controles

Positivo : *P. aeruginosa*

Negativo: *E. coli*

### Resultados

Positivo: Viraje de color hacia el azul -violeta (con el reactivo N, N, N, N, tetrametil-p-fenilenediamina) o púrpura (con el reactivo N, N, dimetil-p fenilenediamina) después de 10 - 15 segundos.

Negativo: No hay viraje de color (Foto N° 23)

Alternativamente una solución de reactivo al 0.5% puede ser goteado directamente sobre la colonia.

**NOTA :** De no ser posible preparar los reactivos, se debe adquirir las tiras comerciales. El 99% de cepas de *P. aeruginosa* son oxidasas positivas.

#### f) Crecimiento a 42° C

Luego del período de incubación observar si hay desarrollo del cultivo en estudio.

##### Resultados

Todas las cepas de *P. aeruginosa* crecen a 42° C.

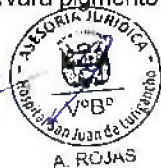
#### g) Producción de pigmentos

Después del período de incubación, realizar la lectura verificando la producción de algún pigmento en el TSA o agar Mueller Hinton.

*P. aeruginosa* produce pigmentos: verdoso o azul verdoso brillante, rojo o marrón. Ocasionalmente algunas cepas de *P. aeruginosa* solo producen pioverdina siendo difícil su diferenciación de otras *P.seudomonas* como *P. fluorescens* o *P. putida*, sin embargo se puede diferenciar de las otras especies por la temperatura de crecimiento (42° C) (7).

##### Lectura:

Si no se observara pigmento dejar la placa incubando a temperatura ambiente y





realizar la lectura a las 48 horas (Foto N° 24).

### 6.3.4.5 Resultados

Realizar la lectura e identificar la especie de acuerdo a la Tabla 7.

**NOTA:** Si se dispone de estufa a 42° C o baño maría graduado a 42° C para la identificación de *P. aeruginosa*, es suficiente realizar las pruebas de: oxidasa, cultivo en TSI, crecimiento a 42° C y demostración de producción de pigmento verde-azulado, rojo o marrón en el agar TSA o Mueller Hinton (7)



Foto N° 19

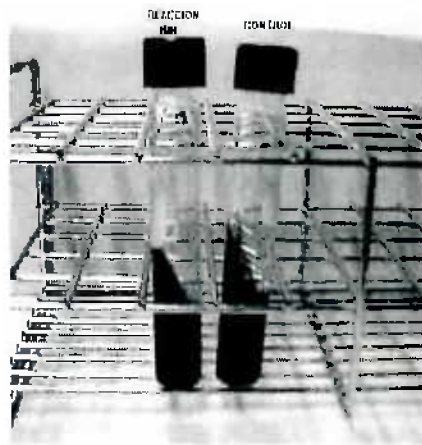
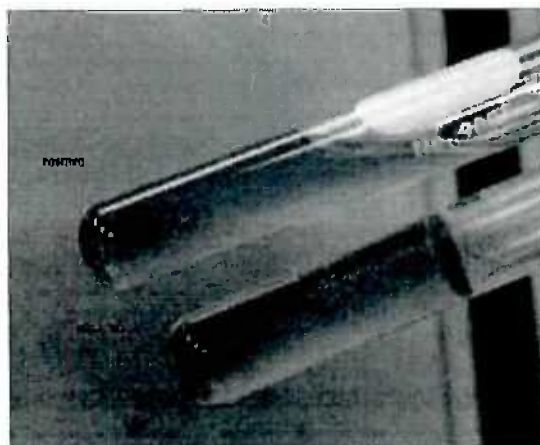


Foto N° 20



R. RAMOS M



A. ROJAS



A. Caldero



Foto N° 21

Foto N°19: Colonias de *Pseudomonas aeruginosa* en agar Mac conkey.

Foto N°20: Reacción bioquímica de *P. aeruginosa* en el agar TSI.

Foto N°21: Hidrolisis de la gelatina

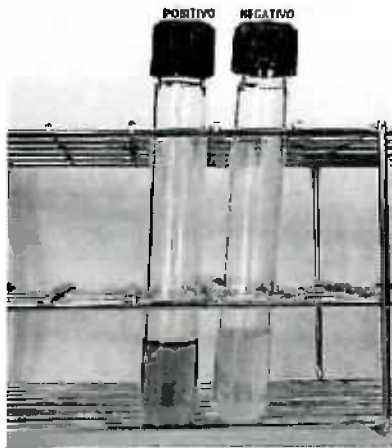


Foto N° 22

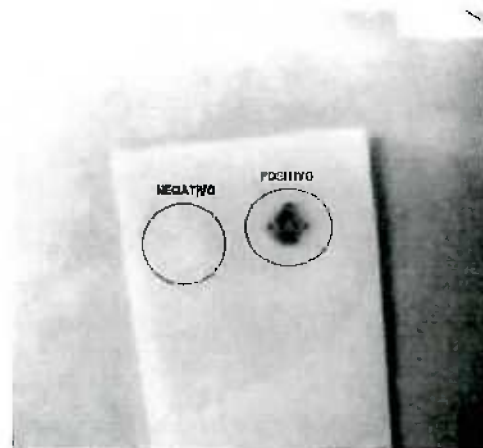


Foto N° 23



Foto N° 24





Foto N°22: Prueba de reducción del Nitrato.

Foto N°23: Prueba de la oxidasa.

Foto N°24: Producción de pigmento en *P. aeruginosa*.

#### Referencias:

- (1) Lauderdale T, Chapin K, Murray P. Reagents. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1665 – 1673.
- (2) Kloos W, Bannerman T. Staphylococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 264 – 282.
- (3) Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 3a ed. 1992, Buenos Aires.
- (4) Mc Faddin J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. México DF: Editorial Médica Panamericana. 1991
- (5) Facklam R, Sahm D, Martins L. Enterococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 297 - 305
- (6) Lauderdale T, Chapin K, Murray P. Reagents. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1665 – 1673.
- (7) Kiska D, Gilligan P. *Pseudomonas*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 517 – 525.







## SECCION 7

### PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE DISCO DIFUSION

Las diferentes especies y cepas de un microorganismo tienen grados variables de susceptibilidad a los antimicrobianos, además esta susceptibilidad puede cambiar especialmente durante el tratamiento. Es por eso que en un proceso infeccioso es importante que el clínico conozca además de la identidad del microorganismo, los antimicrobianos a los cuales es sensible para brindar un eficaz tratamiento. Esta información la debe dar el microbiólogo haciendo un diagnóstico preciso y determinando la susceptibilidad del microorganismo a varios antimicrobianos.

Nota: Solicitar al proveedor de los discos de Para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de las diferentes especies y cepas de un microorganismo se aplica el método de disco difusión el mismo que se describe en el documento M2-A7.17

(1) M100-S11 (M2) 2001 NCCLS Disk Diffusion Supplemental Tables. 2000 NCCLS Performance standard for antimicrobial disk Susceptibility Test: Approved Standard 7° Ed., complementada con las Tablas descritas en el documento

susceptibilidad un certificado de calidad expedido por el Centro de Control de Calidad del INS.

## SECCION 8

### CONTROL DE CALIDAD

El propósito de llevar a cabo el control de calidad en el laboratorio de microbiología es asegurar al médico y al paciente un diagnóstico confiable y oportuno mediante el monitoreo de la exactitud, precisión, calidad de los reactivos y pruebas realizadas, así como el desempeño laboral del personal de laboratorio.

#### 8.1 Control interno de la calidad

8.1.1 Los colorantes y reactivos usados para la identificación bacteriana deben probarse inmediatamente después de la preparación y periódicamente para evaluar las características de tinción esperadas y la correcta reactividad de los medios apropiados con cepas referenciales o de reactividad conocida.

8.1.2 Debe llevarse un registro del control de calidad de los medios de cultivo, colorantes y reactivos en el que se incluya: fecha, número de control o lote, control positivo y negativo utilizado, resultados de la prueba y nombre de la persona que realizó la prueba. Los registros



55





deben estar a disposición de todo el personal del laboratorio.

- 8.1.3 Es necesario llevar registros de temperatura y de mantenimiento de los equipos para documentar el correcto funcionamiento de los mismos y demostrar que los hallazgos de laboratorio constituyeron realmente determinaciones válidas.

## SECCION 9

### REGISTROS

- 9.1 La aplicación de las disposiciones contenidas en el presente Manual exige la generación, uso y conservación de registros necesarios para demostrar el cumplimiento de las especificaciones y requisitos que aseguran la confiabilidad y garantía de los diagnósticos de las infecciones intrahospitalarias.
- 9.2 El personal directivo del establecimiento de salud determina el periodo de conservación de los diferentes registros. Este periodo es definido por las disposiciones contenidas en la reglamentación aplicable al establecimiento de salud.
- 9.3 Los principales registros generados en la aplicación del presente manual son los siguientes:
- 9.3.1 Formulario de solicitud de examen.
  - 9.3.2 Rotulado de la muestra.
  - 9.3.3 Registro de la muestra en el laboratorio.
  - 9.3.4 Datos de las lecturas de las pruebas realizadas y reporte del diagnóstico.
  - 9.3.5 Lectura de los halos de inhibición (mm) de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.
  - 9.3.6 Registros de los controles de calidad.
  - 9.3.7 Registros del control de operación de los equipos.
  - 9.3.8 Registros de calibración y mantenimiento de equipos y medios de medición.
- 9.4 **Formulario de solicitud de examen**
- 9.4.1 El formulario de solicitud de examen, debe ser llenado con letra clara y es firmado por la persona que tomó la muestra e incluye los siguientes datos:
- a) Fecha de solicitud.
  - b) Nombre, edad y sexo del paciente.
  - c) Número de cama (cuarto o sala).
  - d) Tipo de muestra.
  - e) Examen solicitado.
  - f) Sospecha clínica.
  - g) Enfermedad de base.
  - h) Información sobre uso de antimicrobianos.
  - i) Hora de la obtención de la muestra(\*).
  - j) Médico solicitante.

Responsable de la obtención de la muestra.





## BIBLIOGRAFIA

1. Chapin K, Murray P. Stains. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1674 – 1686
2. Chapin K, Murray P. Media. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1687- 1707
3. Facklam R, Sahm D, Martins L. Enterococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 297 – 305
4. Farmer III J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 447- 458
5. Finegold S, Ellen Baron. *Diagnostic Microbiology*. The C.V. Mosby Company 1986. USA
6. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JY, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9a ed. Baltimore: Library of Congress Cataloging.in Publication Data; 1994
7. Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública. *Manual de normas de bioseguridad*. Serie de Normas Técnicas N°18. Lima. 1997
8. Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública. *Manual de Procedimientos Laboratorios para la obtención y envío de muestra* (!). Serie de Normas Técnicas N°15. Lima. 1997
9. Instituto Nacional de Salud. *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de infecciones respiratorias agudas*. Curso Teórico Práctico. En: *Diagnóstico de laboratorio de infecciones respiratorias agudas y enterovirus*. Lima. 1999
10. Isenberg HD. Vol 1: *Clinical Microbiology Procedures handbook*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1992
11. Jorgensen J, Turnidge J, Washington J. Antimicrobial Susceptibility testing: Dilution and disk diffusion methods. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1526 – 1543
12. Kloos W, Bannerman T. *Staphylococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 264 – 282
13. Kiska D, Gilligan P. *Pseudomonas*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 517 – 525
14. Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 3a ed. 1992, Buenos Aires



57

