



Dirección General

RESOLUCION DIRECTORAL

N° 135-2022-DG-HVLH/MINSA

Magdalena del Mar, 24 de agosto de 2022

Visto; la Nota Informativa N° 081-2022-DAMC-HVLH/MINSA, emitida por el Jefe del Departamento de Apoyo Médico Complementario del Hospital Víctor Larco Herrera;

CONSIDERANDO:

Que, los artículos I y II del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud, disponen que la salud es condición indispensable del desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo, y la protección de la salud es de interés público. Por tanto, es responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;

Que la Ley N° 27658, Ley Marco de Modernización de la Gestión del Estado; tiene como finalidad fundamental la obtención de mayores niveles de eficiencia del aparato estatal, de manera que se logre una mejor atención a la ciudadanía priorizando y optimizando el uso de los recursos públicos;

Que, por Resolución Jefatural N° 478-2005-J-OPD/INS, se aprueba el documento normativo MAN-INS-001 "Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos", con el objetivo de establecer la normativa para proteger la salud de las personas que puedan estar expuestas a riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, químicos, físicos, ergonómicos y psicosociales, en los laboratorios de ensayos, biomédicos y clínicos;

Que, mediante Decreto Supremo N° 013-2006-SA, se aprueba el Reglamento de establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo, con el objeto de establecer los requisitos y condiciones para la operación y funcionamiento de los establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo, orientados a garantizar la calidad de sus prestaciones, así como los mecanismos para la verificación, control y evaluación de su cumplimiento;

Que, el literal g) del artículo 7° del Reglamento del Sistema Administrativo de Modernización de la Gestión Pública, aprobado mediante Decreto Supremo N° 123-2018-PCM, señala que la gestión de procesos tiene como propósito organizar, dirigir y controlar las actividades de trabajo de una entidad pública de manera transversal a las diferentes unidades de organización, para contribuir con el logro de los objetivos institucionales. Comprende acciones conducentes a la determinación de los procesos de la entidad, así como a su medición y análisis con el propósito de implementar mejoras en su desempeño, priorizando los procesos que contribuyan al logro de los objetivos de la entidad pública o aquellos que puedan afectar dicho logro, representen mayor demanda, concentren la mayor cantidad o quejas, entre otros similares;

Que, por Resolución de Secretaría de Gestión Pública N° 006-2018-PCM/SGP, se aprueba la Norma Técnica N° 001-2018-SGP, Norma Técnica para la implementación de la gestión por procesos en las entidades de la administración pública; con la finalidad de poner a disposición de las entidades de la administración pública disposiciones técnicas para la implementación de la gestión por procesos, como herramienta de gestión que contribuye con el cumplimiento de los objetivos institucionales y en consecuencia, un impacto positivo en el bienestar de los ciudadanos;

Que, mediante el documento del Visto, el Jefe del Departamento de Apoyo Médico Complementario, remite los Documentos Técnicos, elaborados por la Unidad de Laboratorio Clínico del Hospital Víctor Larco Herrera, denominados: "Manual de Bioquímica", con la finalidad de establecer criterios normativos que aseguren el cumplimiento de los principios básicos de



bioseguridad en el procedimiento de análisis bioquímico de rutina y especializado que contribuyan a la ayuda diagnóstica y a las acciones de salud integral de los pacientes en general; y "Manual de Procedimientos del Área de Microbiología", con la finalidad de contar con un documento normativo que describa de manera ordenada y sistemática los procedimientos que se deben de seguir para realizar el Diagnóstico en Microbiología Clínica en Hospital Nacional Víctor Larco Herrera y solicita su aprobación a través de acto resolutivo;

Que, mediante Nota Informativa N° 085-2022-OEPE-HVLH/MINSA, la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico del Hospital Víctor Larco Herrera, hace suyo el Informe N° 068-2022-UFPOP-OEPE-HVLH/MINSA emitido por la Unidad Funcional Planeamiento, Organización y Proyectos a su cargo, donde se indica que los Documentos Técnicos: "Manual de Bioquímica" y "Manual de Procedimientos del Área de Microbiología", cumplen con la estructura indicada en el numeral 6.1 Estructura de los documentos normativos, que corresponde a lo precisado en el literal 6.1.4 Documento Técnico, señalado en las "Normas para la elaboración de documentos normativos del Ministerio de Salud", aprobada con Resolución Ministerial N° 826-2021/MINSA; razón por la cual cuenta con opinión favorable;

Que, en consecuencia, por convenir a los intereses funcionales institucionales que permitan un mejor cumplimiento de los fines y objetivos de la institución, resulta necesario formalizar su aprobación, mediante la emisión del correspondiente acto de administración;

Con el visto bueno de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, del Departamento de Apoyo Médico Complementario y de la Oficina de Asesoría Jurídica del Hospital Víctor Larco Herrera; y,

De conformidad con lo previsto en el literal c) del artículo 11° del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital "Víctor Larco Herrera", aprobado por Resolución Ministerial N° 132-2005/MINSA.

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Aprobar los Documentos Técnicos:

- **MANUAL DE BIOQUIMICA;** que en documento adjunto a folios treinta y seis (36) forma parte integrante de la presente resolución.
- **MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL ÁREA DE MICROBIOLOGIA;** que en documento adjunto a folios ochenta y un (81), incluido seis (06) anexos, forma parte integrante de la presente resolución.

Artículo 2°.- Encargar al Departamento de Apoyo Médico Complementario a través de la Unidad de Laboratorio Clínico del Hospital Víctor Larco Herrera, su implementación y cumplimiento.

Artículo 3°.- Disponer la publicación de la presente Resolución en el Portal Institucional del Hospital Víctor Larco Herrera. (www.larcoherrera.gob.pe)

Regístrese y comuníquese

Ministerio de Salud
Hospital Víctor Larco Herrera

.....
Med. Elizabeth M. Rivera Chávez
Directora General
C.M.P 24232 R.N.E. 10693

EMRCH/MYRV/

Distribución:

- Departamento de Apoyo Médico Complementario
- Unidad de Laboratorio Clínico
- Oficina de Asesoría Jurídica
- Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico
- Archivo

HOSPITAL NACIONAL VÍCTOR LARCO HERRERA

**DEPARTAMENTO DE APOYO MEDICO
COMPLEMENTARIO**

SERVICIO DE APOYO AL DIAGNOSTICO



UNIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO

DOCUMENTO TÉCNICO

MANUAL DE BIOQUÍMICA

Jefe de la Unidad de Laboratorio clínico
Méd. Esp. Moisés Abel Pajuelo Romero
Responsable
T.M. Gloria Esperanza Cruz Gonzales

2022



ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN3
II.	FINALIDAD3
III.	OBJETIVOS3
IV.	ÁMBITO DE APLICACIÓN3
V.	BASE LEGAL3
VI.	CONTENIDO3
6.1	Definiciones.....	3
6.2	Tipos de Pruebas Bioquímicas.....	4
6.3	Descripción del Tipo de Ensayo.....	5
6.4	Parámetros y Magnitudes e Intervalos de Medición.....	5
6.5	Equipos, Reactivos y Consumibles.....	5
6.6	Procedimiento de Calibración de Equipos.....	6
6.7	Procedimientos de Control de Calidad.....	7
6.8	Pruebas.....	8
6.8.1	Dosaje de Ácido Úrico8
6.8.2	Alanina Aminotransferasa9
6.8.3	Aspartato Aminotransferasa10
6.8.4	Albumina11
6.8.5	Bilirrubinas Totales y Fraccionadas (Método de Jendrasick)12
6.8.6	Colesterol - Método CHOD-PAP-Enzimático13
6.8.7	Colesterol HDL – Colesterol de Alta Densidad14
6.8.8	Colesterol LDL - Colesterol de Baja Densidad16
6.8.9	Creatinina (Método de Jaffe sin desproteinizar)17
6.8.10	Depuración de Creatinina.....	17
6.8.11	Creatina quinasa (CK ó CPK)22
6.8.12	Glucosa (Método de la Glucosa Oxidasa)23
6.8.13	Triglicéridos (Método Enzimático)24
6.8.14	Urea (Método Enzimático)26
6.8.15	Fosfatasa Alcalina (ALP)26
6.8.16	Gamma glutamil transferasa26
6.8.17	Tolerancia a la Glucosa30
6.8.18	Proteínas Totales26



6.9 Rutinas.....	35
6.10 Lineamientos.....	36
VII. RESPONSABILIDADES	36
VIII. BIBLIOGRAFÍA	36

I. INTRODUCCIÓN

El manual de Procedimientos, constituye un complemento del manual de Organización y Funciones, formando y constituyendo ambos la documentación fundamental que sirve para dirigir, organizar y controlar los procesos del Servicio de Apoyo al Diagnóstico.

II. FINALIDAD

Establecer criterios normativos que aseguren el cumplimiento de los principios básicos de bioseguridad en el procedimiento de análisis bioquímico de rutina y especializado que contribuyan a la ayuda diagnóstica y a las acciones de salud integral de los pacientes en general.

III. OBJETIVOS

Normar los procedimientos de análisis bioquímico que permitan guiar y orientar para el trabajo de todo el personal del servicio de Apoyo al Diagnóstico del Hospital Víctor Larco Herrera.

IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Los procedimientos contenidos en el presente manual son de aplicación obligatoria para el personal de la Unidad de Laboratorio Clínico del servicio de Apoyo al Diagnóstico del Hospital Víctor Larco Herrera.

V. BASE LEGAL

- Ley N°26842, Ley General de Salud y sus modificatorias.
- Decreto Supremo N°013-2006-SA aprueba el Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo.
- Resolución de Secretaria de Gestión Pública N° 006-2018-PCM /SGP, que aprueba la Norma Técnica N° 001-2018-SGP, Norma Técnica para la implementación de la gestión por procesos en las entidades de la administración pública.
- Resolución Jefatural N° 478-2005-J-OPE/INS, que aprueba el documento normativo MAN-INS-001, "Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos Clínicos, Biomédicos y Clínicos", Serie de Normas Técnicas N° 18, 3ra. Edición.

VI. CONTENIDO

6.1 Definiciones

Según las normas ISO Norma ISO 15189:2012

Muestra

Una o más partes tomadas de una muestra primaria.

Ejemplo: Un volumen de suero tomado de un volumen mayor de suero.

Análisis



Conjunto de operaciones cuyo objetivo es determinar el valor o las características de una propiedad.

Los análisis de laboratorio que determinan un valor de una propiedad se denominan análisis cuantitativos, aquellos que determinan las características de una propiedad se denominan análisis cualitativos. Asimismo, los análisis de laboratorio también se denominan a menudo analíticas o ensayos.

Plazo de respuesta

Es el tiempo transcurrido entre dos momentos especificados durante los procesos preanalítico, analítico y postanalítico.

Verificación

Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos especificados.

6.2 Tipos de Pruebas Bioquímicas

- Ácido úrico
- Alanina Aminotransferasa
- Aspartato Aminotransferasa
- Albumina
- Bilirrubinas Totales y Fraccionadas (Método de Jendrasick)
- Colesterol - Método CHOD-PAP-Enzimático
- Colesterol HDL – Colesterol de Alta Densidad
- Colesterol LDL - Colesterol de Baja Densidad
- Creatinina (Método de Jaffe sin desproteinizar)
- Depuración de Creatinina
- Creatina quinasa (CK ó CPK)
- Glucosa (Método de la Glucosa Oxidasa)
- Triglicéridos (Método Enzimático)
- Urea (Método Enzimático)
- Fosfatasa Alcalina (ALP)
- Gamma glutamil transferasa
- Tolerancia a la Glucosa
- Proteínas Totales



6.3 Descripción del Tipo de Ensayo

Las concentraciones de los analitos bioquímicos están en función a la metodología empleada para su cuantificación. Generalmente las pruebas tienen una relación directamente proporcional, es decir, cuando tienen una mayor lectura presentan mayor concentración o actividad enzimática. Estas metodologías pueden ser colorimétricas, cinéticas, potenciométricas (Ver Inserto de Pruebas).

6.4 Parámetros y Magnitudes e Intervalos de Medición

Los parámetros, magnitudes y los intervalos de medición son determinados en base a los datos contenidos en los instructivos de trabajo del fabricante (insertos de pruebas).

Parámetros	Unidades	Intervalos de Medición
Bilirrubina Total	mg/dl	Hasta 1.2
Bilirrubina Directa	mg/dl	Hasta 0.3
Glucosa	mg/dl	Hasta 110
Creatinina	mg/dl	Hasta 1.4
Proteínas totales	g/dl	Hasta 8
Albúmina	g/dl	Hasta 5
Úrea	mg/dl	Hasta 50
TGP	U/L	Hasta 36
TGO	U/L	Hasta 40
CPK Total	U/L	Hasta 280
Ácido úrico	mg/dl	Hasta 7
Colesterol total	mg/dl	Hasta 200
Colesterol HDL	mg/dl	Hasta 40
Triglicéridos	mg/dl	Hasta 160
Fosfatasa alcalina	U/L	Hasta 270
Gamma glutamil transferasa	U/L	Hasta 40
Electrolitos (Sodio)	mmol/L	135 - 148
Electrolitos (Potasio)	mmol/L	3.5 - 5.3
Electrolitos (Cloro)	mmol/L	98 - 107

6.5 Equipos, Reactivos y Consumibles

Equipos: CB 350i

Reactivos: Específico para cada prueba (ver Insertos de Prueba).

Cada equipo "Kit" comercial contiene reactivos estables ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración de 2 a 10°C hasta la fecha de su vencimiento.

No se debe almacenar a temperatura fuera de estos intervalos.

Consumibles

- Estándar: solución para calibración.
- Material de Control: Pueden ser controles internos o controles de tercera opinión. Se debe procesar como mínimo 2 niveles de control (Normal y patológico).
- Solución salina (0.85 – 0.90% NaCl) para dilución de muestras.

Para verificar el control de inventarios de reactivos y consumibles referirse al registro inventario de reactivos y consumibles.

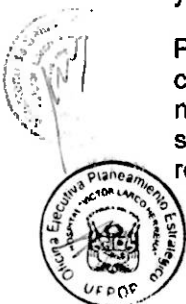
Materiales de Referencia

Calibrador

Condiciones Ambientales y de Seguridad

Las instalaciones permiten el correcto desempeño de los exámenes, a través de adecuadas fuentes de energía, iluminación, ventilación, agua, disposición de residuos y condiciones ambientales de temperatura y humedad (Ver control de temperatura y humedad).

Para asegurar la calidad, seguridad y eficacia del servicio, las instalaciones del laboratorio tienen accesos controlados para mantener confidencialidad de la información, muestras, estudios y resultados para todos nuestros pacientes o clientes, controlando el acceso del personal a áreas donde se procesan muestras y se generan registros y con ello garantizar la seguridad, confidencialidad y resguardo de datos, equipos, registros e información diversa.



Tipo de Muestra

Para el procesamiento de las pruebas bioquímicas generalmente se emplea suero o plasma. Para los tipos de muestras específicas referirse al inserto de pruebas.

Las muestras se obtienen por venopunción obteniendo aprox. 3 ml de sangre total sin anticoagulante. Se separa el suero o plasma dentro de las 2 horas posteriores a la recolección.

Muestra estable en refrigeración entre 2-8° C, durante 3 días. Las muestras no deben contener fibrina ni estar hemolizadas. Compruebe que no haya burbujas en las muestras antes de su procesamiento.

Tipo de Tubos o Contenedores

- Tubo tapa rojo o gel separador
- Contenedor de orina 24 horas

Preparación del Paciente

Existen algunas pruebas que requieren condiciones de ayuno para el paciente como por ejemplo: glucosa, perfil lipídico; sin embargo otras pruebas no requieren dicha condición. Para ver más detalles sobre la preparación del paciente referirse a los insertos de las pruebas.

Criterios de Aceptación / Rechazo de Muestras

Los criterios o requisitos para la aceptación o rechazo de muestras se establecen en Manual de Toma de Muestra, no sin antes realizar una aclaración al cliente de todas aquellas muestras que no cumplan con los criterios o requisitos establecidos.

6.6 Procedimiento de Calibración de Equipos

Existen dos (2) tipos de calibraciones, las calibraciones analíticas y las calibraciones metrológicas.

Para el procedimiento de calibración metrológica del equipo referirse al procedimiento Calibración de Equipos de Laboratorio y en el caso de una calibración analítica referirse al manual de operación del equipo o instrumento, o al instructivo de trabajo específico.

Operación del Analizador

- Si el equipo se encuentra apagado, pulsar el botón de encendido en la parte trasera del equipo.
- Encender el monitor.
- Revisar que existan niveles adecuados de soluciones para el equipo CB 350i (presionando tecla F10). Cambiar solo en caso necesario.
- Eliminar desechos (ver Manual del equipo CB 350i apartado Procedimiento operativo).
- Realizar el mantenimiento diario del equipo.
- Limpieza externa del equipo
- Revisar reactivos a bordo y actualizar inventarios.
- Realizar calibraciones si es necesario.
- Programar en lista de trabajo los controles para las pruebas. Las funciones "Analizar Estándares" y "Analizar Controles" están disponibles en el menú principal "Tests" o través del ícono específico que ofrece el acceso directo.
- Revisar resultados de control de acuerdo al instructivo Evaluación del Control de Calidad Interno.
- Una vez validadas las curvas de calibración y controles, se procede a procesar las muestras de pacientes.
- En caso necesario referirse al manual de operación del equipo CB 350i.

Procedimiento Técnico del Equipo

- El equipo tiene un plato giratorio donde se colocan las muestras y son trasladadas al punto de aspiración.
- Aspira y transfiere la muestra a la cubeta de reacción (CR).
- Dispensa el reactivo de trabajo en la CR.
- Mezcla, incuba y realiza la lectura fotométrica.
- Mide la absorbancia para determinar la cantidad y/o actividad del analito en la muestra.
- Aspira el contenido de la CR y lo transporta al recipiente de desechos líquidos.



6.7 Procedimientos de Control de Calidad

Para asegurar un adecuado control de calidad y resultados confiables, se incluyen como mínimo dos niveles de control: Control Nivel 1 y Control Nivel 2 con valores conocidos que son manejados como muestras desconocidas. Ver instructivo de Planificación del Control de Calidad Interno.

En la medida posible trabajar con controles de tercera opinión (controles interlaboratorio), si esto no es posible, se puede optar por los controles internos del mismo fabricante.

Es recomendable que el laboratorio participe en Programas de Evaluación Externa de Calidad (PEEC) y realice el análisis respectivo de los informes. Ver el instructivo Seguimiento del Programa de Evaluación Externa de la Calidad.

Todo desvío presentado, ya sea en el control interno o externo será identificado como un No Conforme y se llevará el registro y seguimiento respectivo (Ver Seguimiento de No Conformes).

Interferencias o Reacciones Cruzadas

Cada análisis puede verse afectado por interferentes o reacciones cruzadas propias del contenido de las muestras. Para mayores detalles consulte los insertos de pruebas.

Intervalos Biológicos de Referencia

Los procedimientos e intervalos biológicos de referencia se revisan tal cual lo establecen los insertos de las pruebas:

Parámetros	Intervalos de Referencia	Unidades
Bilirrubina Total	Adultos: Hasta 1.2	mg/dl
Bilirrubina Directa	Adultos: Hasta 0.3	mg/dl
Glucosa	Adultos: 60-110	mg/dl
Creatinina	0.6-1.4	mg/dl
Proteínas totales	6.0-8.0	g/dl
Albumina	3.5-5.0	g/dl
Urea	10-50	mg/dl
TGP	Hasta 36	U/L
TGO	Hasta 40	U/L
CPK Total	Hasta 195	U/L
Ácido úrico	3.5-7.2	mg/dl
Colesterol total	Deseable <200	mg/dl
Colesterol HDL	40-60	mg/dl
Triglicéridos	Deseable <160	mg/dl
Fosfatasa alcalina	65-300	U/L
Gamma glutamil transferasa	11-50	U/L
Electrolitos (Sodio)	135-148	mmol/L
Electrolitos (Potasio)	3.5-5.3	mmol/L
Electrolitos (Cloro)	98-107	mmol/L

Valores de Alerta o Críticos

La detección, la notificación y el seguimiento de los valores de alerta/críticos y límites de decisión clínica se determinan utilizando los criterios establecidos en el procedimiento Notificación de Valores Críticos.

Datos a ser Registrados en el Informe de Pacientes

Para la emisión completa de los resultados a los pacientes referirse al procedimiento Informe de Resultados.

Precauciones de Seguridad

- No se mezclan reactivos de lotes diferentes.
- No se usa el kit después de la fecha de caducidad
- Se utiliza guantes de látex desechables.
- Se utiliza bata blanca bien abotonada.
- Los reactivos deben almacenarse en posición vertical.



- Referirse a la ficha técnica del reactivo (inserto).
- Se desechan todas las muestras usadas como desechos biológicos infecciosos.

Fuentes Potenciales de Variabilidad

Se contemplará todas aquellas que puedan generar variabilidad en las mediciones como pueden ser las condiciones según la edad, por enfermedad, por terapias con ciertas drogas, etc. Para mayores detalles referirse a los insertos de las pruebas.

6.8 Pruebas

El servicio de Bioquímica del Dpto. Laboratorio de acuerdo a su MOF y al MAPRO tiene cuatro secciones o sectores de trabajo en las cuales los Tecnólogos Médicos encargados de dicha sección de acuerdo al rol establecido mensual, los Médicos Patólogos Clínicos del servicio, procesarán las siguientes pruebas que a continuación detallamos:

Pruebas Bioquímicas Manuales

En esta sección se llevan a cabo las determinaciones analíticas empleando tubos de ensayo pipetas de vidrio, pipetas graduables de rango fijo y variable, gradillas, etc. Empleándose para ello reactivos estandarizados según los métodos bioquímicos convencionales.

Para el procesamiento en serie se cuenta con cartillas con una serie de valores numéricos obtenidos teniendo en cuenta el factor colorimétrico y las lecturas de fotómetros o espectrofotómetros analógicos o digitales, las cuales aparecen en las pantallas de los mismos equipos.

Las sustancias conocidas sirven como patrón para luego establecer la llamada curva de calibración, de este modo se establecen parámetros que son fundamentales para el control de calidad, teniendo en cuenta que algunas de las pruebas son procesadas empleando Kits autorizados por marcas reconocidas a nivel nacional y mundial.

Urianálisis y Pruebas Especiales de Orina

En esta sección se realizan los exámenes completos de orina, la cual comprende realizar el examen físico, químico y de sedimento urinario además se realizan las pruebas funcionales de orina, generalmente en orina de 24 horas como son la depuración de Creatinina, Proteinuria, Ac. Úrico, calcio, fósforo y otras pruebas especiales de orina.

Especiales

Es la sección en donde se procesan y realizan procedimientos analíticos especiales, los cuales requieren de un mayor conocimiento y entrenamiento del personal de servicio, comprende las pruebas y exámenes citoquímicos de los líquidos de punción (Liq. Pleural, Liq. Ascítico o peritoneal, Liq. Pericárdico), LCR, Liq. Amniótico, examen completo del líquido seminal o espermatograma, pruebas cualitativas de Diagnóstico precoz del embarazo.

6.8.1 Dosaje de Ácido Úrico

Definición

El ácido úrico es oxidado enzimáticamente por la uricasa a alantoina con producción de dióxido de carbono y agua oxigenada. El agua oxigenada originada en la oxidación produce la copulación oxidativa de la 4 aminofenazona con un aceptor mediante una reacción catalizada por la peroxidasa dando lugar a la formación de una quinonimina roja con absorvancia a 505 nm.

Fundamento

Ac. Úrico + O₂ + 2H₂O Uricasa Alantoina + CO₂ + H₂O₂

H₂O₂ + 4 Aminofenazona + diclorofenolsulfonato Peroxidasa Quinonimina + 4H₂O

Las nucleoproteínas están presentes en todas las células y las purinas son el producto de su degradación, cuyo producto terminal más importante es el Ácido úrico. Su fuente principal son las nucleoproteínas de la dieta, especialmente de la carne.

Objetivos

Determinar los niveles en sangre y/o orina de 24 horas, la concentración del Ac. Úrico circulante y su relación con algún cuadro patológico o descartarlo.

Responsabilidad



Esta prueba se realiza en la sección de pruebas bioquímicas en equipos automatizados y las muestras de orina en la sección de orina y especiales. El personal tecnólogo médico, encargado de la sección es el responsable de realizar el procedimiento de acuerdo a las normas establecidas.

Materiales y Equipos

- Muestra; suero o plasma, orina de 24 horas, dieta libre de carnes por tres días.
- Recolección; Obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección.
- Aditivos; en caso que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda el uso de heparina o EDTA para su obtención.
- Estabilidad de la muestra y almacenamiento; emplear suero fresco para el examen, en caso de no poderlo realizar guardar en el congelador hasta 3 días.

Orientación Técnica, Técnica de Punto Final.

Técnica Manual

- Preparar el reactivo de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Dejar atemperar el reactivo durante unos minutos a temperatura ambiente.
- Procedimiento, Pipetear en tubos de ensayo.

	Blanco	Estándar	Muestra
Reactivo Ac. Úrico	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Estándar		20 ul	
Muestra			20 ul

- Agitar bien e incubar en BM a 37° C por 5 minutos, retirar, dejar enfriar y leer.
- Anotar las observancias del estándar y la muestra frente al blanco a 505 nm.
- El color de la reacción final es estable por 30 minutos, por lo que debe de ser leída antes de este tiempo.
- Realizar el siguiente cálculo

$$\frac{\text{Abs. Muestra} \times \text{Concent. St. mg/dl}}{\text{Abs. estandar}} \quad \text{Sangre o Plasma}$$

$$\frac{\text{Ac. Úrico(mg/dl)} \times \text{Vol. Orina 24 h (ml)} \times 10}{100} \quad \text{mg/24 h (Orina)}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Tabla 1. Valor de Referencia

Niños	Varones	Mujeres
2.0-5.5 mg/dl	3.4-7.0 mg/dl	2.4-5.7 mg/dl
Orina 250-750 mg/24 horas		

Interferencia e Implicancia Clínica

Sustancias interferentes conocidas: Sueros ictericos (bilirrubina mayor de 12 mg/dl) o con hemólisis visible no deben de ser usados. Medicamentos: Ácido ascórbico por ser fuertemente reductor, Buscapina por interferir con la reacción.

El ácido úrico es un metabolito de las purinas, ácidos nucleicos y nucleoproteínas. Habitualmente la concentración de ácido úrico en suero varía de un individuo a otro de acuerdo a diversos factores como: sexo, dieta, origen étnico, constitución genética, embarazo. Niveles anormales de ácido úrico en suero son índice de desorden en el metabolismo de las sustancias que lo originan o defectos en su eliminación.

Aumentado

Mieloma múltiple, Leucemia, Policitemia, irradiaciones profundas en tratamientos citostáticos. Insuficiencia renal, insuficiencia congestiva.

6.8.2 Alanina Aminotransferasa

Definición

Las transaminasas son enzimas representadas por proteínas simples conjugadas o sintetizadas por células de diferentes tejidos: hepático, miocardio, renal, nerviosa y músculo estriado. Las cantidades



de estas enzimas son tan pequeñas que no permiten la determinación cuantitativa en miligramos o miliequivalentes, por lo que se expresan en unidades.

Fundamento

Alanina + 2 Oxoglutarato $\frac{\text{ALT}}$ Piruvato + Glutamato
 Piruvato + NADH + H $\frac{\text{LDH}}$ Lactato + NAD
 Medida de la tasa de desaparición del NADH

Objetivo

Determinar los niveles en sangre la actividad enzimática de la ALT (TGP) circulante y su relación con algún cuadro patológico o descartarlo.

Responsabilidad

Esta prueba se realiza en la sección de pruebas bioquímicas en equipos automatizados y en la sección de pruebas manuales. El Tecnólogo Médico encargado de la sección es el responsable de realizar el procedimiento de acuerdo a las normas establecidas en coordinación con la coordinadora de Tecnólogos Médicos del Servicio.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo más posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 12 x 75 o 13 x 100 mm.
- Pipetas automáticas de 100 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o analizador semiautomatizado.
- Reactivo ALT cinético.

6.8.3 Aspartato Aminotransferasa

Definición

Las transaminasas son enzimas representadas por proteínas simples, conjugadas o sintetizadas por células de diferentes tejidos: hepático, renal, miocárdico, nervioso y músculo estriado. Las cantidades de estas enzimas son tan pequeñas que no permiten la determinación cuantitativa en miligramos o milimoles, por lo que se expresan en Unidades. En el hepatocito la AST se encuentra tanto en el citoplasma como en las mitocondrias. En el suero abunda más la AST que la ALT. También se encuentra en la epidermis de la piel, miocardio, músculo estriado, páncreas y riñones. Los glóbulos rojos contienen unas 10 veces más AST que el suero.

Fundamento

Aspartato + 2 Oxoglutarato $\frac{\text{AST}}$ Oxalato + Glutamato
 Oxalato + NADH $\frac{\text{MDH}}$ Malato + NAD

Objetivos

Determinar los niveles en sangre de la actividad enzimática de la TGO AST circulante y su relación con algún cuadro patológico o descartarlo.

Responsabilidad

Esta prueba se realiza en la sección de pruebas bioquímicas en equipos automatizados y en la sección de pruebas manuales. El Tecnólogo Médico encargado de la sección es el responsable de realizar el procedimiento de acuerdo a las normas establecidas en coordinación con la coordinadora de Tecnólogos Médicos del Servicio.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 12 x 75 o 13 x 100 mm.
- Pipetas automáticas de 100 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o analizador semiautomatizado.
- Reactivo AST cinético.

Orientación Técnica, Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones del fabricante

Técnica Manual



- Precalentar el reactivo a 37°C por unos minutos.
 - Pipetear en tubos de ensayo precalentados a 37°C por 5 min.
- Reactivos de trabajo 1ml
Muestra 100 ul
- Agitar bien e incubar a 37°C por 60 segundos.
 - Calibre el 0 del espectrofotómetro a 340 nm con el blanco (agua destilada).
 - Al cabo de un minuto, anotar la Absorbancia inicial de la muestra y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
 - Comprobar que las diferencias entre absorbancias sean sensiblemente iguales.
ABS / MIN x 1768 - UL
 - Si el valor es mayor a 500 U/L hacer diluciones iguales con agua destilada y multiplicar el valor obtenido por la dilución.

Técnica en Equipo Analizador Automático

Valor de Referencia

0 - 40 U/L (37°)

Interferencia e Implicancia Clínica

Aumentado

Infarto de miocardio, hepatitis viral, mononucleosis, obstrucción hepatobiliar, cirrosis, metástasis hepática, pancreatitis aguda, anemia hemolítica e infección renal.

Disminuido

Baja nutrición con piridoxina, mujeres con anticonceptivos orales, hemodiálisis.

6.8.4 Albumina

Definición

La albúmina es una fracción proteica que se forma en el hígado y cuyas funciones primordiales son el transporte de diferentes elementos y sostén de la presión oncótica.

Fundamento

Albumina + Verde de Bromocresol - Complejo coloreado

Objetivo

Cuantificar mediante esta metodología la cantidad de albúmina presente en las muestras de sangre (suero y plasma heparinizado) que se procesen.

Responsabilidad

Los Tecnólogos Médicos son los responsables de la realización de este procedimiento; el Tecnólogo Médico coordinador es el responsable que esto se realice bajo los estándares del Laboratorio y el Jefe del Servicio es el responsable del control periódico del procedimiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero o plasma heparinizado

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 mm o de 12 x 75 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro o analizador semiautomatizado.
- Reactivo de albúmina (VBC).
- Reloj o timer

Orientación Técnica

Técnica Manual

- Pipetear en tubos de ensayo

Reactivos de trabajo 1ml
Muestra 100 ml

- Agitar bien y dejar en reposo a temperatura ambiente por 5 min.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 620 nm con el blanco de reactivo.
- Leer la absorbancia del estándar de la muestra. No dejar pasar más de 30 minutos.



- Realizar el siguiente cálculo.

$$\frac{\text{Abs. Muestra}}{\text{Abs. Estandar}} \times \text{Conc. Estándar} = (\text{Muestra}) \text{ g/dl}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir procedimiento indicado.

Interferencia e Implicancia Clínica

No se observan interferencias por:

Hemólisis moderada

Bilirrubinemia hasta 20 mg/dl

Lipemia hasta 2000 mg/dl

Aumentado

No existe.

Disminuido

Por pérdidas cuantiosas (Hemorragias, albuminuria persistente, paracentesis, catabolismo excesivo) por síntesis defectuosa (Hepatopatías), y por carencia de materia prima (hipoalimentación).

6.8.5 Bilirrubinas Totales y Fraccionadas (Método de Jendrasick)

Definición

La bilirrubinemia indica la cantidad total que circula en el organismo y es el responsable del tinte amarillo que toma la piel cuando sus niveles se elevan. Corresponde a la suma de dos variedades. Es un producto de la hemoglobina y se forma en las células del reticuloendotelial. Una parte se transporta hacia el hígado, se conjuga con el ácido glucurónico y se excreta en el duodeno el cual se denomina bilirrubina directa. La fracción que no es conjugada se denomina bilirrubina indirecta.

Fundamento

La bilirrubina reacciona con el ácido Sulfanílico diazoado en medio ácido, originando un complejo coloreado. El dimetil sulfóxido solubiliza la bilirrubina indirecta (no conjugada) permitiendo su reacción junto con la fracción directa (conjugada).

Objetivo

Medir la concentración de Bilirrubina total y fraccionada presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio de Bioquímica.

Responsabilidad

Los Tecnólogos médicos de la sección correspondiente, son los responsables de la realización de este procedimiento, se realiza bajo los estándares del Laboratorio y el jefe del servicio es el responsable del control periódico del procedimiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero (también en líquido amniótico)

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 2 horas contadas de la recolección. Proteger de la luz artificial o natural. Colocar en frasco oscuro o envolverlo en papel negro.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm
- Pipetas automáticas de 100 ul de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para el procesamiento de bilirrubina.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual

- Pipetear en tubos de ensayo

	Blanco	Directo	Total
Suero	100 ul	100 ul	100 ul
Agua destilada	2.0 ml	2.0 ml	
Caféina			2.0 ml
Ac. Sulfanílico	0.25 ml		
Diazoreactivo(*)		0.25 ml	0.25 ml



Técnica Manual; de punto final.

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (200 mg/dl)	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) Mezclar un ml de reactivo B (colesterol esterasa 5 u/ml + colesterol oxidasa 2u/ml + peroxidasa 20 u/ml + 4-aminoantipirina 12.5 mmol/L) y 24 ml de reactivo A (piper 35 + colato sódico 0.5 mmol/L + fenol 28 mmol/L, pH 7.0).

- Mezclar y dejar en reposo por 10 min. a temperatura ambiente o 5 min. a 37°C.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 505 nm con el blanco.
- Anotar la absorbancia y calcular:

$$\frac{\text{Abs. Muestra} \times 200 \text{ mg/dl}}{\text{Abs. Estándar}}$$

$$\text{Mg/dl colesterol} \times 0.0259 = \text{mmol/L colesterol}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia

Tabla 2. Valores de Referencia (mg/dl)

Edad	Hombres	Mujeres
5-19	110-155	120-160
20-25	125-165	125-170
26-35	130-178	130-176
36-40	140-200	140-180
41-45	145-205	145-195
46-70	160-220	170-230
70	150-205	170-230

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

- Excepto la heparina, los anticoagulantes comunes interfieren en la reacción
- Los sueros con hemólisis intensa o visible producen valores falsamente elevados por lo que no deben ser usados
- En sueros fuertemente hiperlipémicos puede observarse turbiedad, tal caso diluir el volumen final de reacción al ½ o 1/3 con el blanco de reactivos, repetir la lectura y multiplicar el resultado por el factor de dilución
- No se observan interferencias por bilirrubina hasta 20 mg/dl, ni hemólisis ligera.

Implicancia Clínica

Tabla 3. Valores de Referencia (mg/dl)

Edad	Riesgo Moderado	Riesgo Alto
2-20	165	180
21-30	200	220
31-40	220	240
40	240	260

6.8.7 Colesterol HDL – Colesterol de Alta Densidad

Definición

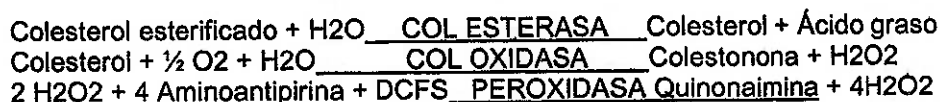
El HDL colesterol es una de las fracciones de la molécula del colesterol y entra en la proporción del 17 %. Es la que contrarresta la acción nociva que pueda tener el LDL sobre nuestro organismo, al evitar la aterosclerosis excesiva, si ella no estuviera presente. Saca del organismo los depósitos de la LDL



y con ayuda de la lecitina – acetil – transferasa, elimina por la bilis cantidades considerables de LDL en forma de ácidos biliares y esteroides neutros.

Fundamento

Los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra precipitan en presencia del fosfotungstato y iones magnesio. El sobrenadante de la centrifugación contiene las lipoproteínas de elevada densidad (LDL) cuyo colesterol se cuantifica por espectrofotometría mediante las siguientes reacciones acopladas:



Objetivo

Medir la concentración del colesterol HDL presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 12 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de colesterol.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual

- Pipetear en tubo, agitar y dejar en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente.

	Muestra
Muestra	100 ul
Reactivo Precipitante (*)	0.5 ul

(*) Fosfotungstato 1.5 mmol/L, Acetato de magnesio 60 mmol/L

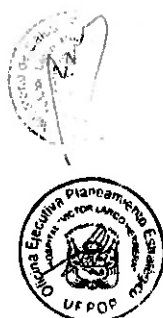
- Centrifugar durante 10 minutos a un mínimo de 4000 r.p.m.
- Recoger el sobrenadante y pipetear en tubos de ensayo según el cuadro siguiente:

	Blanco	Estándar	Muestra
Agua Destilada	100 ul	-	-
Estándar HDL - C	-	100 ul	-
Sobrenadante	-	-	100 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) Mezclar un ml de reactivo B (colesterol esterasa 5 u/ml + colesterol oxidasa 2u/ml + peroxidasa 20 u/ml + 4-aminoantipirina 12.5 mmol/L) y 24 ml de reactivo A (piper 35 + colato sódico 0.5 mmol/L + fenol 28 mmol/L, pH 7.0).

- Mezclar y dejar en reposo por 10 min. a 37°C.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 505 nm con el blanco.
El color es estable durante 30 minutos.
- Anotar la absorbancia y calcular:

$$\frac{\text{Abs. Muestra} \times 200 \text{ mg/dl}}{\text{Abs. Estandar}}$$



Mg/dl colesterol x 0.0259 = mmol/L colesterol

Técnica en Equipo Analizador Automático

Valor de Referencia

Edad	Hombres	Mujeres
5-15	54	51
26-20	46	50
21-30	45	54
31-40	44	52
41-50	45	57
51-60	46	59
61-70	49	61
71-80	48	60

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

- Excepto la heparina, los anticoagulantes comunes interfieren en la reacción
- Los sueros con hemólisis intensa o visible producen valores falsamente elevados por lo que no deben ser usados.
- En sueros fuertemente hiperlipémicos puede observarse turbiedad, tal caso diluir el volumen final de reacción al ½ o 1/3 con el blanco de reactivos, repetir la lectura y multiplicar el resultado por el factor de dilución.
- No se observan interferencias por bilirrubina hasta 20 mg/dl, Ácido ascórbico hasta 7.5 mg/dl, ácido úrico hasta 20 mg/dl, ni hemólisis ligera.

Implicancia Clínica

Para el organismo es muy beneficioso tener un índice elevado de HDL, puesto que al relacionarlo matemáticamente con el HDL se obtiene lo que se denomina Índice Aterógeno o Índice Arterial que es la relación entre LDL y HDL que origina un índice igual a 4 cifras superiores indican envejecimiento acelerado debido al mayor depósito de LDL y por lo tanto, mayor arteriosclerosis. Cifras inferiores a 4 nos indican que estamos envejeciendo normalmente.

6.8.8 Colesterol LDL - Colesterol de Baja Densidad

Definición

El LDL colesterol es una de las fracciones de la molécula del colesterol y entra en la proporción del 50 %. Son producto del metabolismo de las VLDL en plasma son las encargadas del transporte del Colesterol (exógeno y en menor proporción del endógeno) hacia el interior de las células. Un exceso de colesterol LDL debe ser considerado como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria.

Fundamento

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL o Beta lipoproteínas) se separan del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular, luego de centrifugar, en el sobrenadante las demás lipoproteínas (HDL y VLDL); el colesterol ligado a las mismas se determina empleando el sistema enzimático Colesterol Oxidasa/peroxidasa con colorimetría según Trinder. Por diferencia entre el colesterol y el determinado en el sobrenadante, se obtiene el Colesterol unido a las LDL.

Objetivo

Medir la concentración del colesterol LDL presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero (ayuno de 12 horas)



Recolección; obtener suero de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible dentro de las 01 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos precipitantes LDL y para procesamiento de colesterol total.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual

- Pipetear en tubo, agitar y dejar en reposo por 15 minutos a temperatura ambiente

	Muestra
Muestra	200 ul
Reactivo Precipitante (*)	100 ul

(*) Solución 10 g/L de Sulfato de Polivinilo disuelto en polietilenglicol (PM.600) al 25% pH: 6.7

- Centrifugar durante 10 minutos a un mínimo de 4000 r.p.m. o 15 minutos a 3000 r.p.m.
- Recoger el sobrenadante y pipetear en tubos de ensayo según el cuadro siguiente:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (200 mg/dl)	-	10ul	-
Sobrenadante	-	-	50 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) Mezclar un ml de reactivo B (colesterol esterasa 5 u/ml + colesterol oxidasa 2u/ml + peroxidasa 20 u/ml + 4-aminoantipirina 12.5 mmol/L) y 24 ml de reactivo A (pipes 35 + colato sódico 0.5 mmol/L + fenol 28 mmol/L, pH 7.0).

- Agitar los tubos y dejar a 37°C por 10 minutos.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 505 nm con el blanco. El color es estable durante 30 minutos.
- Anotar la absorbancia y calcular el factor con la siguiente fórmula:

$$\frac{0.624}{\text{std}} \quad \text{Cálculo de los resultados Col-HDL= Colest. Total* - (D x F)}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia

- Riesgo bajo o nulo (sujetos normales): menor de 140 mg/dl
- Riesgo moderado (personas con probabilidad de contraer ECC): entre 140 a 190 mg/dl
- Riesgo alto (personas sospechosas de padecer ECC): mayor de 190 mg/dl

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

- Los sueros hipertrigliceridémicos (con quilomicronemia) producen sobrenadantes turbios.
- La bilirrubina interfiere con niveles mayores de 5 mg/dl

Implicancia Clínica

Diversos estudios epidemiológicos han confirmado que el exceso de Colesterol- LDL, con respecto a su valor crítico (190 mg/dl) debe ser considerado como factor de riesgo para el desarrollo de ECC.

6.8.9 Creatinina (Método de Jaffe sin desproteinizar)

Definición

La creatinina se forma en los músculos a partir del fosfato de creatinina y un 2% de dicha sustancia se convierte diariamente en creatinina. Es excretada principalmente por los riñones y una pequeña



cantidad parte con las heces. La creatinina no modifica su nivel en el suero, ni con la dieta, ejercicio, edad, sexo, ni procesos catabólicos.

Fundamento

La creatinina presente en la muestra reacciona con el picrato en medio alcalino originando un complejo coloreado.

Objetivo

Medir la concentración de creatinina presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; recolección

Suero; obtener suero de la manera usual, separar el coagulo lo antes posible dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Orina; de 02 a 24 horas de recolección empleando un recipiente perfectamente limpio y manteniéndolo en el refrigerador (2 – 10 °C) durante la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de creatinina

Orientación Técnica; reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual; cinética.

- Precalentar el reactivo de trabajo a 37°C durante unos minutos.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 505 nm con el blanco de reactivo.
- * Mezclar volúmenes iguales de reactivo A (Ac. Plérico 25 mmol/L) y reactivo NaOHO,2 mmol/L detergente)
- Pipetear en una cubeta precalentada a 37°C:

B (

Reactivo Trabajo* 1.0 ml
 Patrón ** o Muestra 100 ml
 ** Creatinina 2 mg/dl

- Mezclar y poner el contómetro en marcha de inmediato
- A los 30 segundos anotar la absorbancia (A1) y luego a los 90 segundos
- Calcular:

$$\frac{(A2 - A1) \text{ MUESTRAS} \times 2}{(A2 - A1) \text{ PATRON}} = \text{mg/dl}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia:

Hombres: 0.7 – 1.4 mg/dl
 Mujeres: 0.6 – 1.2 mg/dl

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

Hemólisis ligera o moderada no interfiere

Implicancia Clínica

Aumentado

Nefritis aguda, nefrosis por tóxicos, insuficiencia cardiaca avanzada, obstrucciones urinarias, insuficiencia renal crónica.



6.8.10 Depuración de Creatinina

1. INTRODUCCIÓN

El riñón es el órgano vital para mantener la homeostasis interna, el equilibrio hidroelectrolítico y el ácido-base, la presión arterial, el metabolismo de proteínas, purinas, calcio y fósforo y la producción de eritropoyetina; también interviene en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y de varias hormonas y oligoelementos, mediante múltiples procesos fisiológicos que se reflejan en la producción de orina en el periodo de 24 horas a través de la hemodinámica renal, cuyo parámetro fundamental es la filtración glomerular—valores normales de 120 ± 15 mL/minuto (10 % menor en la mujer)—; sus niveles determinan las clasificaciones del grado o estadio de la insuficiencia renal crónica. La filtración glomerular decae con los años: en los adultos de más de 60 años se espera 50 % (60 mL/minuto) del parámetro de referencia. Ante un trasplante renal de riñón único, tanto en el receptor como en el donante vivo se espera un nivel similar, que sería el límite entre suficiencia e insuficiencia.

La elevación en sangre de la creatinina es un indicador de insuficiencia renal crónica: una elevación menor representa un decremento importante de la filtración glomerular, sobre todo en las etapas intermedias, es decir, la elevación de 2 a 4 mg/dL de creatinina sérica manifiesta una pérdida de más de 8 mL/minuto de filtración glomerular, lo cual es de mal pronóstico. Hay que señalar que ésta no se recupera una vez instalada la insuficiencia renal crónica sino que va en constante descenso, de ahí que se habla de la reciprocidad de la creatinina, que se extrapola con el tiempo (meses). La enfermedad renal progresiva crónica es paralela a la fibrosis renal y a la disminución del tamaño de los riñones. Por debajo de 30 mL/minuto se inician los síntomas propios del estado urémico que puede evolucionar a—coma urémico y a muerte, a menos que el paciente ingrese a un programa de diálisis crónica o reciba un trasplante renal, que se indican cuando la filtración glomerular tiene valor por abajo de 5 a 10 % de los niveles normales.

Existen diversas técnicas de laboratorio para dicha medición: inicialmente se utilizaba la llamada hemodinámica renal mediante la infusión y medición de la inulina, ahora en desuso; después se introdujeron técnicas de radioisótopos precisos, cuya realización requiere personal capacitado y experimentado en interpretar la información que se obtiene con el gammagrama renal, así sea

con el equipo más moderno. En los últimos años se ha puesto en práctica, con resultados aceptables, la valoración de la cistatina C y del iohexol, si bien en nuestro país esta última es una técnica poco difundida y costosa hasta el momento. Lo anterior nos lleva a reconocer y aceptar que la técnica más apropiada, confiable, sin limitaciones técnicas y económica es medir la filtración glomerular mediante la depuración de creatinina en orina de 24 horas, cuya principal indicación es que el paciente conozca el procedimiento y coopere en coleccionar correctamente la orina. La depuración de creatinina es una prueba para medir la función glomerular, debido a que la creatinina formada de forma endógena en el músculo se libera a la circulación de una forma muy constante, es removida por el riñón casi exclusivamente por filtración glomerular (con una cantidad muy pequeña de filtración tubular). La función de esta prueba es detectar una lesión renal de preferencia en las primeras etapas del curso del trastorno, localizar el sitio de la lesión y cuantificar el grado de los daños.

2. OBJETIVOS



- Conocer la fundamentación para la determinación de las pruebas de función renal
- Conocer el método de depuración de creatinina y su cálculo
- Relacionar el resultado con el estado renal del paciente

3. FUNDAMENTO

La medición de la filtración glomerular indica el grado de funcionalidad del sistema renal. No obstante el desarrollo de nuevas tecnologías, en la mayoría de los países, la técnica más apropiada y aceptada para medir la filtración glomerular es la depuración de creatinina en orina de 24 horas, que tiene la ventaja de ser confiable, fácil de reproducir, no tiene limitaciones técnicas y, sobre todo, es económica.

4. METODOLOGÍA

4.1. Muestra biológica

1. El día que se inicie la colección de la orina se debe eliminar la primera orina.
2. Reunir la orina en un recipiente (plástico, vidrio, etcétera) limpio y seco.
3. Colectar toda la orina del día (tarde y noche) sin excepción. En caso de que se olvide alguna muestra, suspender e iniciar al siguiente día.
4. Se debe incluir la primera orina del siguiente día y acudir al laboratorio en ayuno.

4.2 Material

- 1 Micropipeta de 1,000 μ L
- 1 Micropipeta de 200 μ L.
- 1 Piseta con agua desionizada o destilada 2 Celdas de plástico de 3 ml
- 5 Tubos de vidrio de 13X100 Puntas para micropipeta Gradilla.

4.4. Equipo

- Espectrofotómetro o Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 490-510 nm.
- Centrífuga
- Incubadora de agua o seca a 37°C

4.5. Reactivos

Utilizar el Kit de reactivos para creatinina por el método colorimétrico de Jaffé.

4.6. Cálculos

El enfermo tiene que llevar la orina al laboratorio personalmente en ayuno para que, además, se le tome una muestra de sangre que mida la creatinina sérica. Con la orina colectada se toma una alícuota y se dosifica la concentración de creatinina en orina y mediante la siguiente fórmula se obtiene la filtración glomerular:

$$\text{Depuración de creatinina} = \frac{U \times V}{P}$$



Donde:

U = creatinina en orina (mg/dL). P =

creatinina en plasma (mg/dL).

V = volumen urinario (mL/minuto), que se obtiene de dividir el volumen urinario colectado entre 1440 (no olvidar que los riñones en condiciones normales producen 1 mL de orina por minuto y el día completo tiene 1440 minutos).

Ejemplo:

$$60 \text{ mg/dL} \times 1 \text{ mL/minuto} = 30 \text{ mL/minuto}$$

$$2.0 \text{ mg/dL}$$

Fórmula que toma en cuenta la superficie corporal:

La fórmula para calcular el aclaramiento es:

$$UCr \text{ (mg/dl)} \times Vu \text{ (ml)} \times 1,73 / SCr \text{ (mg/dl)} \times 1440 \times S$$

Con lo que se obtiene la filtración glomerular en mililitros/minuto.

- ACr es aclaramiento de creatinina.
- UCr es creatinina en orina.
- Vu es volumen de orina.
- SCr es creatinina en suero.
- S es superficie corporal. $S = (P \times T)0,5 / 60$ Los valores

normales están entre 88 y 128 ml/min. Estimación usando la

fórmula Cockcroft-Gault

La fórmula Cockcroft-Gault puede emplearse para estimar el aclaramiento de creatinina, que a su vez estima el IFG:

$$\text{Aclaramiento creatinina} = \frac{(140 - \text{Edad}) \times \text{Peso (en kilogramos)}}{72 \times \text{Creatinina en plasma (en mg/dl)}} \times 0,85 \text{ si es mujer}$$

4.7. Intervalo de referencia

En los hombres, el índice normal de depuración de creatinina es 97 a 137 mL/min. En las mujeres es de 88 a 128 mL/min

4.8. SIGNIFICADO CLINICO

Los estadios tempranos de la enfermedad renal crónica son silenciosos, y solamente pueden ser detectados por los exámenes de laboratorio. La evaluación de la enfermedad renal crónica depende del nivel actual de la función renal. La velocidad de filtración glomerular es considerada la prueba standard de oro para identificar el nivel de función renal tanto en individuos sanos como afectados.

Los estadios de la enfermedad renal crónica de acuerdo a la velocidad de filtración glomerular son:

- Estadio 1: normal= velocidad de filtración glomerular > o igual a 90 mL/min/1,73m².
- Estadio 2: daño renal leve = 60-89 mL/min/1,73m².
- Estadio 3: daño moderado = 30-59 mL/min/1,73m²
- Estadio 4: daño severo = 15-29 mL/min/1,73m²
- Estadio 5: falla renal= < 15 mL/min/1,73m²



La velocidad de filtración glomerular es una medición directa de la capacidad de filtración glomerular; la VFG disminuye en los pacientes glomerulopáticos con aumento en la proteinuria y disminuye en los pacientes con proteinuria baja. La velocidad de filtración declina alrededor del 10% por década después de los 50 años de edad. Algunos pacientes con una significativa velocidad de filtración tienen un ligero aumento de la creatinina sérica. La depuración está calculada en base a la superficie de área del paciente. El porcentaje de error estimado en la determinación de la depuración utilizando orina de 24 horas está entre el 10-15%.

6.8.11 Creatina quinasa (CK ó CPK)

Definición

La creatina quinasa es una enzima que se encuentra normalmente en los músculos estriados en una alta concentración y muy poca se encuentra en el miocardio y en el cerebro.

Fundamento

La creatina quinasa (CK) cataliza la fosforilación del ADP por el fosfato de creatinina, obteniéndose creatina y ATP. La concentración catalítica se determina empleando las reacciones acopladas de la hexoquinasa y glucosa 6 – fosfato deshidrogenasa a partir de la velocidad de formación del NADPH

Fosfato de creatinina + ADP CK Creatina + ATP
ATP + Glucosa HEXOQUINASA ADP + Glucosa- 6-fosfato
Glucosa-6-fosfato + ADP G6F-DH Gluconato-6-fosfato + NADPH + H

Objetivo

Medir la concentración de creatinina presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 16 x 150 mm.
- Pipetas automáticas de 100 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de creatinfosfoquinasa.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual, Cinética

- Precalentar el reactivo de trabajo a 37°C durante unos minutos.
- Pipetear :



	Blanco
Muestra	100 u/L
Reactivo de Trabajo	1.0 mL

- Mezclar y transferir de inmediato a una cubeta e insertarla al termostatzado a 37°C.
- Calibre el cero del Espectrofotómetro a 340 nm con agua destilada.
- A los 30 minutos anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
- Calcular el incremento de absorbancia por minuto promedio.

$$\text{Abs / min} \times 4127 = \text{U / L}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Según procedimiento indicado.

Valor de Referencia

Hombres: 24 - 195 U / L

Mujeres : 24 - 170 U / L

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

Los sueros con Hemólisis visible o intensa producen valores falsamente aumentados, por lo que no deben ser usados. La hemólisis ligera o moderada no interfiere.

Implicancia Clínica

Aumentado

Infarto de miocardio.

6.8.12 Glucosa (Método de la Glucosa Oxidasa)

Definición

La Glucosa debe investigarse con técnicas que dosifiquen únicamente la glucosa verdadera y evitar los sistemas que dosifiquen también otros sacaroides. Hoy en día los mejores son los enzimáticos.

Fundamento

La glucosa presente en la muestra origina, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado cuantificado por espectrofotometría.



Objetivos

Medir la concentración de Glucosa presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio de bioquímica.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el Jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero o plasma recolectado con anticoagulantes comunes



Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 12 x 75 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de Glucosa Enzimática

Orientación Técnica, Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual, cinética

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (100 mg/dl)	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

(*) 4 Aminoantipirina 0.38 mmol/L + fenol 0.75 mol/L + Glucosa Oxidasa 15 U/ml + peroxidasa 1.5 U/ml + mutaratos 2 ml

- Agitar bien y dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la observancia del estándar y de la muestra frente al blanco a 505 nm antes de 15 minutos.
- Calcular:

$$\frac{\text{Abs. Muestra} \times 100 \text{ mg/dl}}{\text{Abs. Estándar}}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia

70- 110 mg/dl

Interferencias

- Los sueros o plasmas con Hemólisis visible o intensa deben ser desproteinizados, como se indica en la técnica de sangre total
- No se observan interferencias por Bilirrubina hasta 20 mg/dl, Ácido Ascórbico hasta 7.5 mg/dl, Ac. Úrico hasta 20 mg/dl, hemólisis ligera.

Implicancia Clínica

Aumentado

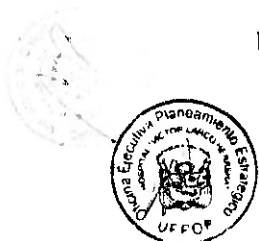
Diabéticos, excitaciones psíquicas, esfuerzos musculares, baños calientes prolongados y alteraciones traumáticas.

6.8.13 Triglicéridos (Método Enzimático)

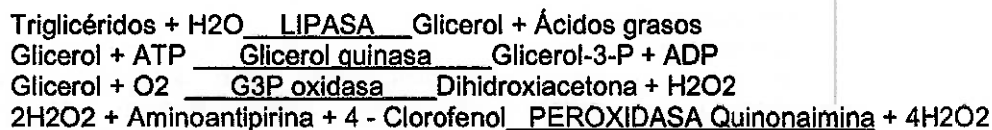
Definición

Los triglicéridos (TG) forman parte del peso seco del tejido adiposo constituyendo por lo tanto una potente forma de almacenamiento de energía. El movimiento de ácidos grasos entre los distintos compartimientos del organismo, se produce con gran rapidez en respuesta a diversos estímulos (dieta, actividad física, stress, edad, etc.) por este motivo es de esperar que los triglicéridos varíen su concentración en respuesta a estos factores fisiológicos.

Fundamento



Los triglicéridos según las reacciones acopladas descritas a continuación forman un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



Objetivo

Cuantificar mediante esta metodología la cantidad de triglicéridos presentes en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización de este procedimiento se realice bajo los estándares del laboratorio y el jefe de servicio es el responsable del control periódico del procesamiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero

Recolección; obtener suero de la manera usual con un ayuno de 12 a 14 horas. Separar el coagulo lo antes posible dentro de las 2 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 12 x 75 mm.
- Pipetas automáticas de 10 ul y de 1000 ul.
- Espectrofotómetro digital o Analizador semiautomatizado.
- Reloj o timer.
- Reactivos para procesamiento de Triglicéridos.

Orientación Técnica

Reconstituir el reactivo de acuerdo a instrucciones.

Técnica Manual, del punto final

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar (200mg/dl)	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo Trabajo (*)	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

- Agitar bien y dejar reposar por 5 minutos a temperatura 37°C.
- Leer la observancia del estándar y de la muestra frente al blanco a 546 nm antes de 15 minutos
- Calcular:

$$\frac{\text{Abs. Muestra} \times 200 \text{ mg/dl}}{\text{Abs. Estándar}}$$

Técnica en Equipo Analizador Automático

Seguir el procedimiento indicado

Valores de Referencia

10 – 200 mg/dl

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

- Hemólisis (moderada o intensa) pueden producir valores falsamente aumentados.



- En sueros con exceso de Lipasa pancreática los triglicéridos se degradan muy rápidamente. Para evitar tal inconveniente se recomienda procesarlos a la brevedad.

Implicancia Clínica

Aumentado

Se asocia a varias patologías, tales como enfermedad hepática renal hiperlipidemias esenciales, etc. Como caso especial es el aumento de los TG en pacientes obesos, en los cuales tiene importancia pronóstica en desarrollar enfermedad cardíaca coronaria.

Disminuido

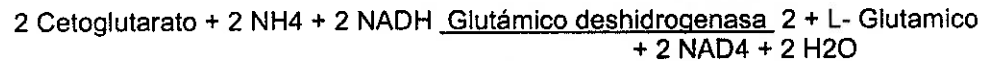
Sin mucha importancia.

6.8.14 Urea (Método Enzimático)

Definición

La Urea constituye una de los principales metabolitos del metabolismo proteico, se produce en el ciclo de la urea o ciclo de Krebs – Henseleit a nivel hepático, para ser eliminado luego por la vía urinaria.

Fundamento



Objetivo

Medir la concentración de Urea presente en las muestras de sangre (suero) que se procesen en el servicio.

Responsabilidad

Los tecnólogos médicos de la sección correspondiente son los responsables de la realización que este procedimiento se realice bajo los estándares de laboratorio y el jefe de servicio es el responsable del control periódico del procedimiento.

Materiales y Equipos

Muestra; suero u orina de 24 horas.

Recolección; obtener suero o plasma de la manera usual, separar el coágulo lo antes posible, dentro de las 02 horas contadas de la recolección.

Materiales; estos son:

- Tubos de 13 x 100 o de 12 x 75 mm
- Pipetas automáticas de 50, 100 y 1000 ul
- Espectrofotómetro digital o analizador automático
- Reloj
- Reactivo para procesamiento de Urea.

Orientación Técnica

Técnica Manual; cinética

- Precalear el reactivo de trabajo a 37°C durante unos minutos.
- Calibre el cero del espectrofotómetro a 340 nm con agua destilada.
- Pipetear en una precalentada a 37°C

Reactivo Trabajo*	1.0 ml
Patrón**o Muestra	100 ul



- Mezclar y poner el cronometro en marcha de inmediato
- A los 30" anotar la absorbancia (A1) y luego a los 90" (A2)
- Calcular:

$$\frac{(A2 - A1) \text{ MUESTRA X } 50}{(A2 - A1) \text{ PATRON}} = \text{mg/dL}$$

Técnica en Equipo Analizador Semiautomático

Seguir procedimiento indicado.

Valor de Referencia

20-40 mg/dL

Interferencia e Implicancia Clínica

Interferencias

Los anticoagulantes que contienen fluoruro inhiben la acción de la ureasa.

Los vapores amoniacales contaminan la muestra, produciendo valores falsamente elevados.

Evitar la exposición a dichos contaminantes.

Implicancia Clínica

Aumentado

La hiperazoemia puede tener:

- Origen doble
- De origen renal: nefritis agudas, nefrosis por tóxicos, obstrucciones urinarias
- De origen extra-renal. Insuficiencia cardiaca avanzada, deshidratación cloropénica, cuadros neurológicos, fiebre.

Disminuido

Nefrosis, amiloidosis y en la insuficiencia hepática aguda.

6.8.15 Fosfatasa Alcalina (ALP)

Definición

La fosfatasa alcalina se encuentra ampliamente distribuida en los órganos del cuerpo humano. Fuentes de importancia clínica son: hígado, hueso, placenta, intestino, bazo y riñón. Aunque se desconoce su función biológica precisa, aparentemente participa en el transporte de membrana, ya que está unida a la membrana celular. En el hígado, la actividad de la ALP se localiza en la membrana celular que une el borde sinoidal de las células del parénquima a los canalículos biliares. En los huesos la actividad de la ALP se localiza en la membrana celular que une el borde sinoidal de las células del parénquima a los canalículos. En los huesos, su actividad se confina a los osteoblastos. El aumento de actividad de fosfatasa alcalina en suero se observó en diversas afecciones; sin embargo, su significado clínico se relaciona principalmente con la detección de enfermedades óseas y hepáticas. La actividad de la ALP es útil para el diagnóstico diferencial de enfermedades hepáticas. La fosfatasa alcalina suele elevarse más en caso de afecciones de los conductos biliares, que en las que se produce principalmente la lesión hepatocelular. Por lo tanto en la enfermedad hepática coléstatica u obstrucción hepatobiliar, la ALP suele incrementarse hasta 10 o 15 veces más que los valores normales, pero en general sólo se observan leves elevaciones de 2 a 3 veces los valores normales en afecciones hepatocelulares como hepatitis. Además, la síntesis de esta enzima se estimula por la colestasis. Otras afecciones hepáticas que también incrementan la actividad de la fosfatasa alcalina son: la mononucleosis infecciosa, la colangiolititis, la cirrosis total, carcinoma hepatocelular primario y carcinoma hepático metastático secundario, también incrementan la actividad de



la fosfatasa alcalina. La ALP también se sintetiza en las células osteoblásticas, en donde se produce la formación de hueso. Por tanto, en afecciones óseas con incremento de actividad osteoblástica, en general los niveles de fosfatasa alcalina se elevan. En algunas afecciones que incluyen hipotiroidismo, escorbuto, hipofosfatemia, Kwashiorkor (niño rojo), cratinismo y anemia grave, se observa reducción de la actividad de fosfatasa alcalina. Es muy complicada la interpretación de la medición de la fosfatasa alcalina sérica, debido a que la actividad de la enzima puede aumentar en ausencia de enfermedad hepática. También se incrementa la actividad de la fosfatasa alcalina sérica durante la pubertad debido al crecimiento acelerado de los huesos y, durante el tercer trimestre del embarazo debido a la liberación de la fosfatasa alcalina por la placenta.

OBJETIVOS

Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la enzima fosfatasa alcalina ALP en una muestra biológica

Establecer los valores normales de referencia de la actividades de esta enzima y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Definir cuáles son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de estas enzimas en una muestra biológica.

FUNDAMENTACIÓN

La fosfatasa alcalina realmente es un grupo de enzimas que hidrolizan los ésteres de monofosfatos a un pH alcalino. El pH óptimo para estas enzimas es generalmente de aproximadamente 10. No se conocen los substratos naturales para la fosfatasa alcalina. La actividad más alta de la fosfatasa alcalina se observa en el hígado, los huesos, el intestino, el riñón y la placenta, y se han identificado por lo menos 11 isoformas diferentes de la fosfatasa alcalina en el suero. Puesto que la fosfatasa alcalina contiene normalmente cantidades significativas de ácido siálico, la mayoría de estas formas múltiples de la enzima son el resultado de diferentes grados de sialación. Se sabe que la enzima producida por la placenta tiene una composición proteica diferente de las otras composiciones enzimáticas. En general las fosfatasas catalizan la hidrólisis de los ésteres del ácido fosfórico. En función de los valores de pH a los que logran su actividad óptima, se distinguen dos tipos de fosfatasas: la alcalina y la ácida.

Para la determinación de las fosfatasas según Bessey, Lowry y Brock, se utiliza como sustrato p-nitrofenilfosfato, que por la acción de la enzima se escinde en p-nitrofenol (cromógeno amarillo) y ácido fosfórico.

METODOLOGÍA

Muestra biológica

Suero, plasma heparinizado. La actividad del enzima debe ser determinada rápidamente o bien separar el suero de los hematíes. La pérdida de la actividad enzimática es menor de un 10% entre 2 a 3 días a 15- 25°C o durante 1 mes a -20°C.

Material

5 tubos de ensaye de 13 X100mm. 1 Micropipetas de 1.0 mL.
1 Micropipeta de 50mL. Puntas para micropipeta. Gradilla

4.3. Equipo

Espectrofotómetro o Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm.
Centrífuga



6.8.16 Gammaglutamiltranspeptidasa

Definición

La GGT (o g-GT) es una enzima localizada en la membrana que juega un papel importante en el metabolismo del glutatión y en la reabsorción de los aminoácidos del filtrado glomerular y de la luz intestinal. El glutatión (g-glutamylcisteinilglicina) en presencia de la GGT y un aminoácido o péptido transfiere el glutamato al aminoácido formando un enlace péptido en el ácido g-carboxílico, formando, por consiguiente, cisteinilglicina y el péptido g-glutamyl correspondiente. Aunque la mayor actividad de la GGT se presenta en el tejido renal, la elevación de la GGT generalmente es un indicador de la enfermedad hepática. La GGT sérica se eleva antes que las otras enzimas hepáticas en enfermedades como la colecistitis aguda, la pancreatitis aguda, la necrosis hepática aguda y subaguda, y neoplasias de sitios múltiples que cursan con metástasis hepáticas. Puesto que la GGT es una enzima microsomal hepática, la ingestión crónica de alcohol o drogas como los barbitúricos, los antidepresivos tricíclicos y los anticonvulsivantes inducen la producción de enzimas microsomales. Estas elevaciones inducidas por drogas preceden cualquier otro cambio en las enzimas del hígado y si se suspende la ingestión de la droga en ese momento, los cambios del hígado son generalmente reversibles. La GGT permite la diferenciación de otras enfermedades hepáticas en las cuales por sus condiciones se eleva la fosfatasa alcalina sérica, puesto que los niveles de GGT son normales en la enfermedad de Paget, el raquitismo y la osteomalacia y en los niños y mujeres embarazadas sin enfermedad hepática. Asimismo, puesto que la próstata tiene una actividad significativa de GGT, la actividad sérica es mayor en hombres sanos que en mujeres. La mayor utilidad de la GGT está en el diagnóstico de colestasis causadas por la ingestión crónica de alcohol o drogas, colestasis mecánicas o virales, metástasis hepáticas, desórdenes óseos con elevaciones de la fosfatasa alcalina, pero en los que la GGT es normal y desórdenes de músculo esquelético en los cuales la transaminasa ASAT está elevada pero la GGT está normal.

OBJETIVOS

Conocer la fundamentación del método.

Demostrar el manejo adecuado de la técnica para la determinación de la gama

glutamyltransferasa en una muestra biológica.

Establecer los valores de referencia de la enzima GGT y comparar con el valor de nuestra muestra problema a analizar.

Definir cuáles son las principales patologías que se presentan si se presentan valores altos o bajos de GGT en una muestra biológica.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Se mide la actividad de la γ -glutamyl transferasa mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la γ -glutamyl transferasa cataliza la transferencia de un grupo gamma-glutamyl desde el sustrato incoloro gamma-glutamyl-p-nitroanilina, al aceptor, glicilglicina, y genera un producto coloreado, la p-nitroanilina.

GGT

g-glutamyl-p-nitroanilina + glicilglicina \rightarrow g-glutamyl-glicilglicina + p-nitroanilina

En el inserto ¿cuál ha sido el cambio que se ha realizado a la fundamentación?

METODOLOGÍA



4.1 Material biológico

Solamente utilizar suero. No utilizar plasma. La γ -GT es estable en el suero 8 horas a 15- 25°C, 3 días a 2-8°C y un mes congelado a -20°C.

Material

5 tubos de ensaye de 13 X100mm. 1 Micropipetas de 1.0 mL.
1 Micropipeta de 200mL. Puntas para micropipeta. Gradilla

Equipo

Espectrofotómetro ó Fotómetro termostable a 37°C con filtro de 405 nm.
Centrífuga

6.8.17 Tolerancia a la Glucosa

Definición

La prueba de tolerancia a la glucosa es una prueba natural, que permite establecer la respuesta insulínica frente a un estímulo fisiológico por glucosa. Las personas sanas metabolizan la glucosa a mayor velocidad que los enfermos diabéticos, éstos tienen falta total o parcial de insulina o de su efecto biológico, lo que ocasiona que los niveles de hiperglucemia, después de ingerir glucosa, sean mayores y persistan más tiempo que en las personas con un metabolismo normal. La rápida absorción de la glucosa provoca elevación del CHO en sangre lo que desencadena la liberación de insulina (preformada en las células beta) en cantidad suficiente para cubrir las necesidades, o sea aumentar la captación de la glucosa por los tejidos, en especial el hígado donde se almacena en forma de glucógeno. En un sujeto sano el nivel máximo de glucosa después de la absorción rara vez sobrepasa de 150 mg/dl, las cifras normales se recobran generalmente antes de las dos horas y desde luego antes de las tres horas contadas a partir de la ingestión de glucosa.

OBJETIVO

o Determinar la concentración de glucosa durante un estímulo por glucosa oral dosis única y posprandial en una muestra biológica mediante el método enzimático glucosa-oxidasa.

FUNDAMENTO

El fundamento es establecer la capacidad que tiene el organismo de un individuo para metabolizar una dosis fija de glucosa administrada por vía oral. Su objetivo es diagnosticar o descartar diabetes u otros cuadros relacionados con resistencia a la insulina. Los métodos más utilizados más comúnmente para evaluar la tolerancia a una sobrecarga de glucosa pueden ser:

- Pruebas de tolerancia utilizando una dosis única oral de glucosa.
- Pruebas de tolerancia con una dosis intravenosa de glucosa.

La prueba más común de tolerancia a la glucosa es la oral. Después de una noche de ayuno (8 a 14 horas), se toma una muestra de sangre 2 horas después de



ingerir una carga oral de 75 g de glucosa. Las mediciones intermedias no se realizan de manera rutinaria, a menos que sea solicitado por el médico. Por este motivo se eliminó el término "curva de tolerancia a la glucosa".

Además, el paciente no puede comer durante el examen y se recomienda informar al médico acerca del uso de medicamentos que pueden afectar los resultados del examen. Con frecuencia se solicita la medición de los niveles de insulina (hormona producida por el páncreas que permite introducir la glucosa desde la sangre hasta las cada una de las células del cuerpo). Cuando se suministra la glucosa por boca, la absorción desde el tracto gastrointestinal hacia la sangre continúa durante un lapso variable, que depende de la cantidad de glucosa suministrada. La máxima absorción de glucosa se estima en 0,8 g/kg de peso por hora.

La tolerancia a la glucosa suministrada por vía oral, mide el balance entre la velocidad de pasaje de la glucosa al fluido extracelular y su separación por la asimilación celular y la excreción urinaria, si la hubiere. Por tanto, la prueba puede influirse no sólo por aquellos factores vinculados con la utilización de la glucosa, sino también por los que influyen en su absorción. Las pruebas intravenosas de tolerancia a la glucosa son poco comunes. Para realizar este tipo de prueba, al paciente se le inyecta por vía venosa una cantidad conocida de glucosa durante tres minutos, previa la medición de los niveles de insulina en la sangre en el minuto uno y en el tres.

2. METODOLOGIA

El protocolo correcto para la administración de la Prueba de tolerancia oral a la glucosa es el siguiente:

CONDICIONES DEL PACIENTE

- La persona come normalmente durante los 3 días que preceden la prueba; sin restricción de carbohidratos (CHO), pero integrará a uno de sus días un total de 100 gr de glucosa, lo que se consigue comiendo al final de sus comidas un pan dulce con mantequilla y abundante mermelada o cajeta.
- La persona no come ni toma nada (excepto el agua en razonables cantidades) durante las 8 – 12 horas antes de la prueba.
- La persona debe descansar (no estar activa) durante las 2 horas de la prueba.
- La persona no debe fumar durante las horas de ayunas ni durante las 2 horas de la prueba.
- Otros factores pueden distorsionar el poder diagnóstico de la prueba y deben evitarse: inactividad física severa en las semanas anteriores a la prueba, estar obligado a estar en cama durante varios días anteriores a la prueba, estrés médico



(enfermedad) o quirúrgico, algunas drogas (tiazidas, β -bloqueadores, glucocorticoides, fenitoína).

Procedimiento correcto aceptado para la Prueba de tolerancia oral a la glucosa

- La Prueba de tolerancia oral a la glucosa debe administrarse en las horas matutinas (antes de las 12 horas).
- Se toma una muestra de sangre, en ayunas.
- La persona tiene que tomar vía oral toda la glucosa anhidra (300-350 ml) en un período de menos de 5 minutos.
- Dos horas después de iniciar la ingesta de la glucosa anhidra, se toma la segunda muestra de sangre. El resultado de glucosa sanguínea de esta segunda muestra se utiliza para el diagnóstico de la DM.

El método recomendado para la determinación es glucosa-oxidasa

Algunos estudios utilizan pruebas iniciales a -10 minutos (en ayunas, 10 minutos antes de tomar la glucosa anhidra) y a 0 minutos (al momento en que la persona empieza a tomar la glucosa anhidra). En otros estudios, realizan 7 medidas de la glucosa sanguínea en 2 horas, ú 11 medidas de la glucosa sanguínea en 5 horas, o hasta 21 medidas de la glucosa sanguínea en 7 horas. El procedimiento estándar es de 1 medición (a dos horas de haber empezado a tomar la glucosa anhidra líquida) o de 2 mediciones (en ayunas y a dos horas después de haber empezado a tomar la glucosa anhidra líquida). Así, no es obligatorio hacer las 2 mediciones, pero el primero (en ayunas) puede ser útil para determinar la presencia de hiperglucemia. En cuanto a los riesgos y los síntomas que pueda presentar una persona si le administra una carga de glucosa oral sin conocer su valor de glucemia previa a la prueba, serán pocos. El riesgo principal sería de elevar aún más la glucosa sanguínea que ya está anormalmente alta. Cada gramo de glucosa sube la glucosa sanguínea aproximadamente 5 mg/dL. Así, los 75 gramos de glucosa anhidra podrían adicionar 375 mg/dL de glucosa sanguínea al valor inicial (suponiendo la ausencia de insulina suficiente). Por eso, esta prueba está contraindicada para personas que clara u obviamente tienen DM.

La ADA recomienda el uso de la Prueba de tolerancia oral a la glucosa principalmente en casos inciertos (por ejemplo, un día la glucemia está elevada en ayunas, el siguiente día es normal en ayunas). Si la persona ya tiene niveles elevados (más de 125 mg/dL en ayunas), sólo se esperaría un día más para monitorear la glucosa en ayunas otra vez, para confirmar el diagnóstico de DM. Si



la persona ya tiene niveles muy elevados (200 mg/dL ó más) de glucemia, la prueba en ayunas o al azar también lo indicará y no será necesario proceder con La Prueba de tolerancia oral a la

glucosa, porque junto con los síntomas de DM, un nivel de 200 mg/dL equivale al diagnóstico de la DM.

La presencia de grandes cantidades de cetonas (++) ó (+++) ó (++++) ó de cetoacidosis sería una contraindicación al uso de la Prueba de tolerancia oral a la glucosa. Normalmente, para que haya cetoacidosis, la glucosa sanguínea tiene que estar elevada (resultado de insuficiente insulina en el cuerpo y resultado prácticamente idéntico con el diagnóstico de DM). El diagnóstico de DM gestacional utiliza una frecuencia distinta de medición glucémica durante la prueba y valores diagnósticos distintos.

INTERVALOS DE REFERENCIA

Después de dos horas de haber tomado la dosis de glucosa los resultados siguientes nos indican el diagnóstico:

Niveles de glucosa en sangre (Glucemia)	Diagnóstico
Menor a 140 mg/dL	Normal.
Entre 140 y 200 mg/dL	Prediabetes, intolerancia a la glucosa o resistencia a la insulina.
Mayor a 200 mg/dL	Signos de diabetes mellitus.

Los criterios utilizados para definir la condición de anormalidad de una curva de tolerancia, se basan en el nivel o pico elevado alcanzado por la concentración sanguínea y la falta de retorno al nivel normal, 2 horas después de la ingestión de glucosa, siendo este último el más importante. Un valor hipoglucémico (bajo de glicemia) de 3 a 5 horas después de la ingestión de la glucosa se observa en ciertos pacientes cuya curva de tolerancia era de tipo diabético, interpretándose un hiperinsulinismo, típico del estado diabético. En personas con tolerancia normal a la glucosa, la glucemia no suele sobrepasar los 7,8 mmol/l (140 mg/dl) como respuesta a las comidas y, por lo general, regresa a los niveles previos a las dos o tres horas.(26;27) La Organización Mundial de la Salud define como tolerancia normal a la glucosa tener <7,8 mmol/l (140 mg/dl) a las dos horas de ingerir una carga de glucosa de 75 g dentro del contexto de una prueba oral de tolerancia a la glucosa.(28) En esta guía, se define como hiperglucemia posprandial un nivel de glucosa en plasma >7,8 mmol/l (140 mg/dl) a las dos horas de ingerir alimentos.



6.8.18 Proteínas Totales

Definición

Las proteínas son los principales sólidos disueltos en el plasma sanguíneo. Para la síntesis de las proteínas séricas se requiere un hígado sano en plenas funciones, excepto en el caso de las gamma globulinas. El hígado tiene la capacidad de duplicar la producción y salida de proteínas durante las enfermedades asociadas con pérdida de proteínas. En consecuencia, no debe sorprender que las mediciones de proteínas totales no se alteren sino hasta que haya ocurrido una disminución extensiva de la función hepática. La proteína total del suero se compone de por lo menos varios cientos de proteínas individuales, algunas en cantidades muy pequeñas y otras como la albúmina y la inmunoglobulina G (IgG) en cantidades mayores. La concentración de proteína total es útil como un indicador aproximado de la nutrición, de la función gastrointestinal, como indicador de la viscosidad del plasma, y es la base para la cuantificación de las fracciones obtenidas por electroforesis. Una exagerada deficiencia de proteínas en la dieta y ciertas condiciones patológicas que involucran a la absorción intestinal, dan como resultado una baja concentración de proteínas séricas lo que se denomina hipoproteinemia. La hiperproteinemia se define en términos de proteínas séricas totales de más de 9.0 g/dl, y puede deberse casi exclusivamente a hipergammaglobulinemia. Las proteínas totales se dividen en: albúmina y globulinas. Las globulinas son un grupo muy grande de proteínas que se subclasifican en alfa, beta y gamma globulinas.

Cuando se les separa por electroforesis (defina electroforesis) se observan cinco fracciones: la más anódica es la prealbúmina y la albúmina, luego la alfa 1, alfa 2, beta y gamma, siendo éstas últimas las más catódicas.

Si además queremos separar inmunoglobulinas podemos hacer una inmunolectroforesis (defina inmunolectroforesis), teniendo como resultado la separación de las cinco fracciones de las gamma globulinas, que son: la G, A, M, E y D. dibuje a continuación una inmunolectroforesis de la fracción gamma de las proteínas séricas. Además si se requiere identificar a una globulina en particular existen metodologías para realizarlo. Por ejemplo, se cuantifica la transferrina, todas las proteínas de la coagulación, las gammaglobulinas, la transcobalamina, la hemopexina, haptoglobina, etc.

1. OBJETIVO

- determinación de Proteínas totales



muestra problema a analizar.

- Definir cuáles son las principales patologías que se presentan si tenemos valores altos o bajos de proteínas.

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Existen varios métodos para la determinación de proteínas plasmáticas: a) técnicas densimétricas basadas en la ley de Van Slyde, b) técnicas refractométricas las cuales usan un refractómetro y se basan en el índice de refracción, c) técnicas colorimétricas, de las cuales la más utilizada es el método de Biuret.

Todos los métodos se basan en peso por volumen, por lo que deberán estar estandarizados con métodos gravimétricos. Las proteínas y los péptidos, al contrario que otros compuestos nitrogenados (urea, ac. Úrico y creatinina) dan en solución alcalina con iones cobre un complejo de color violeta, esta reacción se llama Biuret. Sus resultados son reproducibles y coinciden con el estándar de oro que es el método de Kjeldhal.

3. METODOLOGIA

4.1 Material biológico

Suero o plasma de un paciente con 8 horas de ayuno, o en fase postabsortiva (ayuno) Conservación de la muestra: si el suero se separa rápidamente y se conserva en congelación, se conserva bien siempre y cuando no se repita la operación varias veces porque pueden sufrir desnaturalizaciones. Si se conservan en refrigeración los tubos deberán estar bien tapados para evitar la evaporación, se puede emplear plasma usando heparina.

6.9 Rutinas

Estas se clasifican en dos:

- Rutinas del Servicio

- Recepción y proceso de muestras de sangre de pacientes ambulatorios y/o hospitalizados.
- Recepción y proceso de muestras de orina simple y de 24 horas de pacientes.
- Recepción y proceso de muestras de líquidos corporales en pacientes ambulatorios y/o hospitalizados.

- Urgentes del Servicio

- Recepción y proceso de muestras de sangre y orina en pacientes hospitalizados.



6.10 Lineamientos

- Es responsabilidad de todo el personal que labora en el Laboratorio de Análisis Clínicos cumplir con estos lineamientos.
- El trabajador utilizará el equipo de protección personal durante sus actividades en el laboratorio.
- Es responsabilidad y obligación del personal cumplir las normas del laboratorio en cuanto a: seguridad, limpieza, orden, manejo de equipo y manejo de residuos biológicos.

VII. RESPONSABILIDADES

El jefe de la Unidad debe revisar y vigilar el cumplimiento de estos procedimientos, y el personal de laboratorio tiene que aplicar y cumplir el presente manual para la Unidad de Laboratorio Clínico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Instituto Nacional de Salud. (2005). Manual de bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3a. ed. Lima, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 108p. (Serie de Normas Técnicas; 18)
- ISO 15189:2003. Medical laboratories. Particular requirements for quality and competence. ISO 2003.
- Norma UNE-EN ISO 15189:2012, Laboratorios Clínicos, Requisitos Particulares para la Calidad y Competencia, Madrid, AENOR, Deposito Legal: 17477: 2013.





PERÚ

Ministerio
de Salud

Viceministerio
de Prestaciones y
Aseguramiento en Salud

Hospital
Víctor Larco Herrera

"Decenio de la Igualdad de Oportunidades para Mujeres y Hombres"
"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

HOSPITAL NACIONAL VÍCTOR LARCO HERRERA

DEPARTAMENTO DE APOYO MEDICO COMPLEMENTARIO

SERVICIO DE APOYO AL DIAGNOSTICO



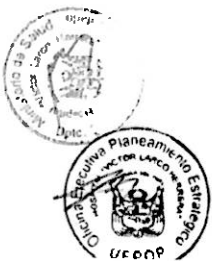
UNIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO

DOCUMENTO TÉCNICO

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL AREA DE MICROBIOLOGÍA

Jefe de la Unidad de Laboratorio clínico
Méd. Esp. Moisés Abel Pajuelo Romero
Responsable
T.M. Gloria Esperanza Cruz Gonzales

2022



ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	3
II.	FINALIDAD	3
III.	OBJETIVOS	3
IV.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	3
V.	BASE LEGAL	4
VI.	CONTENIDO	4
6.1	Normas generales de trabajo	4
6.2	Datos de los procedimientos	5
VII.	RESPONSABILIDADES	57
VIII.	ANEXOS:	57
IX.	BIBLIOGRAFIA	57



I. INTRODUCCIÓN

El presente manual reúne las técnicas y procedimientos de trabajo en el área de Microbiología del laboratorio del Hospital Nacional Víctor Larco Herrera.

Este Manual puede ser especialmente valioso si consideramos la constante renovación de técnicas y procedimientos que se realizan con Personal profesional Calificados.

La normalización de los métodos de trabajo es la condición fundamental para, independientemente de la persona que procese la muestra o realice las técnicas, conseguir que los resultados sean estandarizados, obteniéndose así un máximo nivel de calidad y reproducibilidad.

Las Técnicas que se describen han sido adoptadas luego de estudios realizados por Laboratorios Referenciales como son el Instituto Nacional de Salud y OMS. Se incluyen también las modificaciones existentes hasta la actualidad, basadas en la experiencia acumulada en el Servicio y coordinada con los Laboratorios Referenciales. Se acompañan de las referencias bibliográficas en que se fundamentan.

Cualquier modificación o sustitución de estas Técnicas o Procedimientos, deberán ser autorizadas expresamente por escrito, con la firma del jefe de Servicio.

II. FINALIDAD

Contar con un documento normativo que describa de manera ordenada y sistemática los procedimientos que se deben de seguir para realizar el Diagnóstico en Microbiología Clínica en el Hospital Nacional Víctor Larco Herrera.

III. OBJETIVOS

Optimizar la contribución del laboratorio de microbiología a la salud del paciente, evitando errores que la vulneren. Brindar una información veraz, confiable y reproducible:

IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este Manual tiene jurisdicción en las Secciones del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Víctor Larco Herrera. El personal que labora en el Servicio, está obligado a conocer el contenido del presente manual.



V. BASE LEGAL

- Ley N° 26842, Ley General de Salud y modificatorias.
- Decreto Legislativo N°1161, ley de Organización y Funciones del Ministerio de Salud y sus modificatorias.
- Decreto Supremo N°013-2006-SA, que aprueba el Reglamento de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo y sus modificatorias.
- RESOLUCIÓN Ministerial N°753-2004-MINSA, que aprueba la NTS N°020-MINSA/DIGSP-V.01" Norma Técnica de Prevención y Control de Infecciones Intrahospitalarias".
- Resolución Ministerial N°523-2007-MINSA, que aprueba la "Gula Técnica para la evaluación interna de la vigilancia, prevención y control de infecciones intrahospitalarias".
- Resolución Ministerial N°727-2009-MINSA, que aprueba el Documento Técnico Política Nacional de Calidad en Salud.
- Resolución Ministerial N°168-2015-MINSA, que aprueba el Documento Técnico: "Lineamientos para la vigilancia, prevención y control de las infecciones asociadas.
- Resolución Ministerial N°523-2020/ MINSA, que aprueba la NTSA N°163-MINSA/2020/CDC, Norma Técnica de Salud para la Vigilancia de las Infecciones asociadas a la Atención de la Salud.

VI. CONTENIDO

6.1 Normas generales de trabajo

6.1.1 De la recepción de muestras

- El personal que labora está obligada a recibir las muestras en el ambiente de 7 a.m. a 19 p.m. debe ser realizado en el área de Microbiología.
- Es de su responsabilidad la recepción y la procesamiento de muestras en el turno correspondiente.
- Las muestras serán recepcionadas según el tipo de análisis en los horarios establecidos a requerimiento de los Servicios Asistenciales, salvo nueva indicación determinada en casos excepcionales.

6.1.2 De los resultados

- El encargado de cada turno deberá dejar, para la firma del jefe del servicio, los resultados adjuntos a las solicitudes de análisis, en forma diaria, respetando el tiempo rutinario para cada análisis.
- Los resultados firmados serán registrados en los cuadernos pertinentes, de modo que estarán listas para entregar al personal asistencial y/o paciente de consultorios y pabellones en el horario de 7 a.m. a 19 p.m.
- Los duplicados de resultados serán atendidos en forma condicional a disponibilidad de tiempo, de lo contrario deberán esperar para ser atendidos a partir de las 15 p.m.
- Al finalizar el año se hará un inventario del material consumido y del restante para el siguiente año. De igual manera se hará un recuento de todo el material de trabajo en uso en el área de Microbiología.



6.2 Datos de los procedimientos

6.2.1 Preparación de medios de medios de cultivo:

Fundamento:

Para su crecimiento las bacterias requieren sustancias nutritivas similares al medio natural donde viven, por lo cual es importante conocer la procedencia de la muestra para escoger el medio de cultivo apropiado.

Componentes de los medios de cultivo:

- ✓ Nutrientes aminados y nitrogenados: peptonas, proteínas predigeridas por hidrólisis ácida, extractos o infusiones acuosas de materiales proteicos.
- ✓ Factores de crecimiento: sangre, suero, vitaminas, NAD, sustancias termolábiles. La sangre completa en algunos casos es un medio protectoro contra radicales tóxicos.
- ✓ Fuente de Energía: glucosa, lactosa u otro carbohidrato. Otros medios usan peptonas o citrato.
- ✓ Sales tamponadas: sales de fosfato, acetato y citratos como fuente de energía y para mantener el pH.
- ✓ Sales minerales y metales: fosfatos, sulfatos, Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} , Mn^{++} y trazas de metales que pueden ser adicionadas en macro (mg/l) o micro (ug/l) niveles para mejorar el crecimiento, mejoramiento e identificación de una reacción bioquímica en particular.
- ✓ Agentes selectivos: químicos, antibióticos, colorantes inhibidores, etc.
- ✓ Colorantes indicadores: Rojo fenol, rojo neutro, púrpura de bromocresol: indican cambios en el pH del medio en las diferentes fases de crecimiento.
- ✓ Agentes gelificantes: Agar, gelatina o alginato. Agar: es un extracto de algas, contribuye con metales, minerales sulfato, piruvato, etc.

Hay que tener presente que las cantidades macro y micro deben ser empleadas con precisión en la elaboración de las diferentes fórmulas, así como la temperatura, presiones, etc.

Clases de medios de cultivos:

1. Por su estado físico:
 - a. Líquidos: caldos, tienen 0 % de agar.
 - b. Sólidos: contienen entre 1,2 a 1,5 % de agar
 - c. Semisólidos: tienen entre 0.3 a 0.8 % de agar
 - d. Bifásicos
2. De acuerdo a su aplicación en:
 - ✓ Medios nutritivos simples: caldo y agar nutritivos. Para cultivo de la mayoría de bacterias.
 - ✓ Medios nutritivos de enriquecimiento: permiten crecimiento de mayor número de bacterias, se utiliza cuando el inóculo o muestra tiene un número reducido de ellas. Ej. Caldo tripticase soya, caldo selenito, medio de hemocultivo
 - ✓ Medios nutritivos enriquecidos: agar sangre y agar chocolate. Para microorganismos exigentes.
 - ✓ Medios selectivos o especiales: Agar Mac Conkey y agar hipertónico de Chapman, etc. Favorecen el crecimiento de algunos grupos bacterianos e inhiben a otros.



- ✓ Medios diferenciales: ponen de manifiesto la actividad bioquímica de un microorganismo para diferenciarlo de otro parecido.
- ✓ Medios para transporte: Cary Blair, Stuart, etc. Permite transporte y viabilidad de microorganismos.

6.2.2 Preparación de los principales medios de cultivo:

Procedimientos generales:

- a) Calibrar la balanza analítica, generalmente de platillos: equilibrar los platillos hasta que la aguja esté en el cero.
- b) Pesar los Agares (polvo), de acuerdo a las indicaciones de los Medios a preparar.
- c) Pesar los otros reactivos a usar, de acuerdo a los medios a preparar.
- d) Medir el agua destilada de acuerdo a la cantidad que requieren los medios a preparar.
- e) Diluir los agares en el agua destilada con movimientos de rotación y a diferentes temperaturas, de acuerdo a los requerimientos de cada medio.
- f) Controlar el pH de los medios preparados.
- g) Auto clavar a 121°C a 15 libras de presión (250°F) x 15'
- h) Esperar a que tome la temperatura adecuada para ser repartido en frascos, placas o tubos estériles.
- i) Colocar la cinta de Control de Esterilidad.
- j) En casos de Medios de Hemocultivos o Mielo cultivos, se Auto clavan nuevamente después de repartir en los frascos.
- k) La cinta de control de esterilidad debe tener un color oscuro.
- l) Control de esterilidad: dejar por 24 horas a temperatura de 37°C
- m) Refrigerar entre 2-8 °C hasta el momento de su uso.
- n) Registrar en cuaderno de control de stock las cantidades producidas por tipo de medio y fecha.

Logística de medios de cultivo en el área de microbiología – HVLH:

- CALDO NUTRITIVO:
- CALDO PEPTONADO
- CALDO SELENITO
- MEDIO MR-VP

CALDO TRIPTICASE SOYA (Hemocultivos)

- Medio nutritivo bifásico:
- AGAR TRIPTICASA SOYA
- AGAR MULLER HINTON
- AGAR NUTRITIVO
- AGAR MANITOL SALADO
- AGAR SANGRE
- AGAR CHOCOLATE
- AGAR MC CONKEY
- AGAR DE MAC CONKEY CON SORBITOL



- AGAR CITRATO
- AGAR SS
- AGAR UREA
- AGAR TCBS
- AGAR THAYER MARTIN
- CALDO THIOGLICOLATO
- MEDIOS DIFERENCIALES: TSI
- MEDIOS DIFERENCIALES: LIA
- MEDIOS DIFERENCIALES: SIM
- AGAR SABORAUD 500 ml
- AGAR CARY BLAIR

Descripción de la preparación de los principales medios de cultivo

A. MEDIOS NUTRITIVOS SIMPLES

CALDO NUTRITIVO

Composición:

- | | |
|---------------------|-----------|
| - Extracto de carne | 0.3 g |
| - Peptona | 1.0 g |
| - Dextrosa | 0.5 g |
| - Cloruro de sodio | 0.5 g |
| - Agua destilada | 100 ml |
| - pH | 7.0 – 7.4 |

Preparación:

1. Disolver en agua destilada los ingredientes previamente pesados.
2. Someter a la acción del calor, agitando constantemente hasta llegar al primer hervor.
3. Ajustar el pH con las tiras indicadoras de pH. Si está por debajo de 6.8 (ácida) agregar gota a gota la solución NaOH, si por el contrario está por encima de 7.4 (alcalino) agregar gota a gota la solución de HCl, hasta pH adecuado (7.0 – 7.4).
4. Envasar el medio en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos
5. Controlar la esterilidad colocando el medio envasado en una incubadora a 37°C por 24 hrs.
6. Mantener el medio envasado en la refrigeradora hasta el momento de usarlo.

CALDO PEPTONADO

Medio líquido no selectivo utilizado como diluyente y para el enriquecimiento bacteriano

A partir de alimentos y otros materiales de interés sanitario.



Fórmula g/L
Peptona bacteriológica 10.0
Cloruro de sodio 5.0
pH 7.2 +_ 0.2

Preparación

Suspender 15 g en 1 L de agua destilada o desionizada, mezclar bien, distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C por 15 min.

Descripción

El Agua Peptona es un medio de enriquecimiento no selectivo recomendado para ser utilizado en sustitución de solución fisiológica, con el propósito de realizar diluciones de microorganismos en grandes cantidades para el recuento de su viabilidad; para la recuperación de células de enterobacterias dañadas por procesos físico-químicos a los que han sido sometidos los alimentos y otras muestras.

Puede ser utilizado como diluyente en diferentes procedimientos en los laboratorios de microbiología y como medio basal en la realización de pruebas bioquímicas de fermentación de hidratos de carbono, al adicionarse a la formulación un indicador y el carbohidrato correspondiente.

Se recomienda el uso del medio para el cultivo y enriquecimiento de *Vibrio cholerae*1, después de ajustar el pH a 8.4.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

CALDO SELENITO

Base destinada a la preparación del medio de enriquecimiento utilizado para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella* en heces, orina, aguas y otros materiales contaminados.



Documento Técnico: Manual Técnico de Procedimientos en Microbiología

Fórmula	g/L
Hidrolizado enzimático de caseína	5.0
Lactosa	4.0
Fosfato monosódico	10.0

pH 7.0 +_ 0.2

Preparación

Disolver 4 g de biselenito de sodio en 1 L de agua destilada o desionizada, añadir 19 g de la base, calentar hasta ebullición, esterilizar en un baño de agua hirviente por 10 min. Evitar el sobrecalentamiento excesivo. No esterilizar en autoclave. Distribuir en tubos estériles hasta una altura de 5 cm.

Descripción

La formulación de este medio es esencialmente la misma que la del Caldo F de Selenito descrita por Leifson¹. Handel y Theodorascu, de acuerdo con Guth², observaron mayor sensibilidad de la *Escherichia coli* a la toxicidad del selenito de sodio, que de la *Salmonella Typhi*. Leifson desarrolló un Agar con Selenito y un Caldo con Selenito para uso en el aislamiento de bacilos tífoides y paratífoides en heces y orina y descubrió mayores ventajas en el caldo enriquecido.

El biselenito de sodio inhibe el desarrollo de organismos coliformes y enterococos en las primeras 6 a 12 horas de incubación, permitiendo la recuperación de *Salmonella*, *Proteus* y *Pseudomonas*.

Después del enriquecimiento de los especímenes en el Caldo Selenito, se debe rayar sobre placas de medios selectivos tales como: Agar S.S. (cód. 4021) y Agar de MacConkey (cód. 4014).

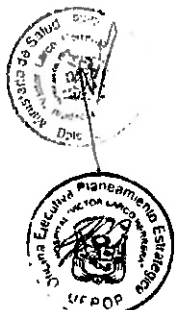
Los tubos de Caldo Selenito inoculados se incuban de 18 a 24 horas a 35 +_ 2 °C.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

MEDIO MR-VP

Medio recomendado para la diferenciación bioquímica de bacterias coliformes basada en las pruebas de rojo de metilo y Voges - Proskauer.



Fórmula	g/L
Peptona bacteriológica	7,0
Dextrosa	5,0
Fosfato dipotásico	3,6
Fosfato monopotásico	1,4

pH 6,9 +_ 0.2

Preparación

Suspender 17 g en 1 L de agua destilada o desionizada. Mezclar bien. Distribuir en tubos.
Esterilizar a 121 °C por 15 min.

Descripción

Voges y Proskauer han descrito la aparición del color rojo después de adicionar el hidróxido de potasio a los cultivos microbianos en el medio especial con glucosa¹.

La prueba de rojo de metilo fue encontrada por Clark y Lubs, en 1915, y se convierte en una característica importante para la identificación de especies bacterianas del grupo de coliformes, capaces de producir ácidos en altas concentraciones a partir de la degradación de la glucosa y mantener el pH en valores inferiores a 4,4 contrariamente a los microorganismos aerógenos². Esta acidificación es detectada por el indicador rojo de metilo, produciéndose un cambio de coloración de amarillo a rojo cuando se adiciona al medio.

La formación de acetilmetilcarbinol durante la fermentación de la glucosa en ciertas especies de enterobacterias (grupo Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Hafnia), puede ser detectada a través de la prueba de Voges-Proskauer. La acción directa del KOH (NaOH) y el oxígeno atmosférico, así como la posterior reacción con compuestos presentes en el medio, dan lugar a un complejo de color rojo. La aparición del color rosa o rojo se observa durante 30 segundos. Barry y Feeney³ obtuvieron resultados más rápidos adicionando la creatina.

Durham⁴ observó que Enterobacter aerogenes daba reacción positiva debido a la oxidación de acetilmetilcarbinol, producto de acetil, que reacciona con la peptona del medio y produce color rojo^{5,6}. Por otra parte, Durham detectó que Escherichia coli no producía color rojo derivando de ello la correlación que existía entre el rojo de metilo y el Voges-Proskauer⁷ en el proceso de fermentación de la lactosa por los organismos coliformes.

El tiempo de incubación para la prueba de rojo de metilo debe ser al menos 48 h a 35 °C. La segunda porción del cultivo se utilizará para la prueba de Voges-Proskauer.



Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

AGAR TRIPTICASA SOYA

Medio de propósito general para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos.

Fórmula	g/L
Hidrolizado enzimático de caseína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

pH 7.3 +_ 0.2

Preparación

Suspender 40 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, esterilizar a 121 °C por 15 min y distribuir.

Descripción

El Agar Triptona Soya es un medio de cultivo de uso general empleado durante muchos años para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos tanto aerobios como anaerobios. La USP1 recomienda el uso de este medio para el conteo de microorganismos aerobios y pruebas de límites microbianos. Además el medio se emplea para el mantenimiento y conservación de cultivos puros y aislamiento de microorganismos de especímenes clínicos.

Este medio puede utilizarse como Base de Agar Sangre^{2,3,4} para lo cual al medio previamente esterilizado y enfriado a temperatura de 45 - 50 °C se le adiciona 5 - 7 % de sangre de carnero, caballo o humana, desfibrinada y estéril. De esta manera se hace posible utilizar el mismo para determinar reacciones hemolíticas, así como para el estudio de la sensibilidad bacteriana ante agentes antimicrobianos. También es empleado en la preparación del Agar Chocolate garantizando un buen crecimiento de *Neisseria*, *Haemophilus influenzae* y otros organismos.

Los tubos o placas con el medio inoculado deben incubarse de 18 a 24 horas a 35 +_ 2 °C.

Como precaución debe tenerse en cuenta que la respuesta de las reacciones hemolíticas de los estreptococos puede variar de acuerdo al origen de la sangre (caballo o carnero).



Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

AGAR DE MUELLER-HINTON

Medio para la evaluación de la sensibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos.

Fórmula	g/L
Hidrolizado ácido de caseína	17.5
Extracto nutritivo	2.0
Almidón soluble	1.5
Agar	17.0

pH 7.3 +_ 0.2

Preparación

Suspender 38 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, esterilizar a 121 °C por 15 min y distribuir.

Descripción

Mueller y Hinton (1941) idearon y describieron un medio de cultivo reproducible para el aislamiento de especies patógenas de *Neisseria*¹, sin embargo, estos organismos son ahora comúnmente aislados en medios selectivos, tales como el Agar de Thayer-Martin modificado (MTM)² y el Agar de Martin-Lewis³. Posteriormente se desarrollaron numerosos procedimientos para la determinación de la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos y a los agentes quimioterapéuticos.

Bauer, Kirby y otros describieron un procedimiento estandarizado, utilizando como medio de prueba el Agar de Mueller-Hinton^{4,5} y discos de antibióticos con elevada potencia.

La técnica consiste en la inoculación de las placas de Agar de Mueller-Hinton con un inóculo estandarizado, utilizando hisopos de algodón humedecidos con la suspensión de microorganismos a estudiar y colocando cuidadosamente los discos de papel impregnados con una concentración específica de antibióticos sobre la superficie del agar, incubando posteriormente el medio de 18 a 24 horas a temperatura de 37 °C. Concluida la incubación, se miden los diámetros de las zonas de inhibición y se comparan con los requerimientos establecidos por el Comité de la Organización Mundial de la Salud sobre las Pruebas de Susceptibilidad Estandarizada⁶. Según el resultado obtenido, se



califica el microorganismo como resistente, intermedio o sensible para el anti-biótico que se analiza.

En esta prueba de sensibilidad se deben tener en cuenta una serie de factores que puedan influir en el resultado a obtener, tales como la calidad del medio, pH del mismo, la profundidad del agar, la potencia del disco, la concentración del inóculo, la producción de beta lactamasa por el organismo en cuestión, etc..

La formulación puede ser suplementada para obtener los mejores resultados.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

AGAR NUTRITIVO

Composición:

- | | |
|---------------------|--------------------|
| - Extracto de carne | 3 g |
| - Peptona | 5 g |
| - Agar | 15 g |
| - Agua destilada | 1000 ml |
| - pH | 6.8 +/- 0.2 a 25°C |

Preparación:

1. Disolver en agua destilada los ingredientes previamente pesados en 1000 ml de agua destilada.
2. Someter a la acción del calor, agitando constantemente para que se disuelva por completo, hasta llegar al primer hervor.
3. Ajustar el pH con las tiras reactivas de pH. Si está por debajo de 6.8 (ácida) agregar gota a gota la solución NaOH, si por el contrario está por encima de 7.0 (alcalino) agregar gota a gota la solución de HCl, hasta pH adecuado (6.8 – 7.0).
4. Envasar el medio en tubos o placas Petri y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos
5. Controlar la esterilidad colocando el medio envasado en una incubadora a 37°C por 24 hrs.
6. Mantener el medio envasado en la refrigeradora hasta el momento de usarlo.
7. El medio debe ser de color ámbar claro, de transparente a ligeramente opalescente.

AGAR MANITOL SALADO

Medio selectivo para el aislamiento y enumeración de Staphylococcus en alimentos y muestras clínicas.



Fórmula	g/L
Peptona bacteriológica	4.0
Peptona bacteriológica P	5.0
Extracto nutritivo	1.0
Extracto de levadura	2.0
Hidrolizado enzimático de caseína	4.0
Manitol	10.0
Cloruro de sodio	70.0
Rojo fenol	0.0083
Agar	15.0

pH 7.4 \pm 0.2

Preparación

Suspender 111 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, esterilizar a 121 °C por 15 min y distribuir.

Descripción

El Agar Manitol Salado es un medio selectivo preparado de acuerdo con la fórmula sugerida por Chapman, para el aislamiento presuntivo de estafilococos patógenos.

En 1942 Koch reportó que sólo los estafilococos crecían en medios agarizados que contenían un 7,5 % de cloruro de sodio¹. Chapman confirmó esta conservación y notó que la adición de un 7,5 % de cloruro de sodio en Agar Manitol y Rojo Fenol proporcionaba un medio en el cual los estafilococos que coagulaban el plasma del conejo crecían en forma exuberante, produciendo colonias amarillas rodeadas por una zona amarillo brillante. Los estafilococos no patógenos producían colonias pequeñas sin cambio de color en el medio circundante. Otras bacterias eran generalmente inhibidas, haciendo posible el empleo de un inóculo grande sin peligro de sobrecrecimiento.

El empleo de este medio también puede darse en la detección y enumeración de estafilococos coagulasa-positivos en leche, alimentos y otros especímenes.

Durán y col., en 2004, han optimizado la composición de bases nutritivas y la concentración del colorante, aumentando la rapidez en la visibilidad de la reacción (cambio del color del medio de rojo a amarillo).

Se recomienda la incubación durante 36 h a 37 °C.

La adición de emulsión de huevo al 5 % v/v en el Agar Manitol Salado facilita, además de fermentación del manitol por los estafilococos, la detección de la actividad de la lipasa. Debido a la alta concentración de sal en el medio junto con la emulsión de yema de huevo se observan las zonas sin inocular claras, y con la producción de la lipasa por las colonias de estafilococos que producen esta enzima se detecta una zona amarilla opaca alrededor de las colonias.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C



B. MEDIOS NUTRITIVOS ENRIQUECIDOS

AGAR SANGRE

Preparación:

1. En un frasco licuar 100 ml de agar nutritivo estéril, en baño maría a 55°C.
2. Dejar enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45°C, hasta que el calor sea soportable en el dorso de la mano.
3. Agregar 5 ml de sangre nitrada o desfibrinada de carnero con una pipeta estéril. Agitar por rotación en forma suave, con el fin de obtener una buena mezcla y evitar la formación de burbujas.
4. Su color normal debe ser de color rojo cereza homogénea.
5. Repartir en placas Petri estériles y dejar solidificar.
6. Controlar la esterilidad colocando el medio envasado en una incubadora a 37°C por 24 hrs.
7. Mantener el medio envasado en la refrigeradora hasta el momento de usarlo.

AGAR CHOCOLATE

Preparación:

1. Preparar agar sangre hasta obtener su color normal rojo cereza
2. Llevar el agar sangre antes de su solidificación al baño maría a 80°C por 10 minutos. Por el calentamiento, el color rojo cereza cambiará al chocolate por ruptura de los hematíes y la salida de la hemoglobina.
3. Durante el calentamiento mezclar constantemente para evitar la formación de precipitado (grumos)
4. Repartir con cuidado en las placas Petri, evitar la formación de burbujas.
7. Otra manera de preparar agar chocolate es utilizar como base un agar de Mueller Hinton mezclado con sangre de carnero.

C. MEDIOS SELECTIVOS O ESPECIALES

AGAR MAC CONKEY

Composición:

- Peptona	17.0 g
- Proteosa peptona	3.0 g
- Lactosa	10.0 g
- Sales biliares	1.5 g
- Cloruro de sodio	5.0 g
- Agar	13.5 g
- Rojo neutro	0.03 g
- Cristal violeta	0.001 g
- pH	7.1



Preparación:

1. Para rehidratar el medio suspender 50 gr de Agar Mac Conkey en 1000 ml de agua destilada fría.
2. Calentar hasta el punto de hervor para disolver el medio completamente.
3. Esterilizar en la autoclave durante 15 minutos a 121°C.
4. Cuando el medio se ha enfriado a 50°C, repartir en placas Petri más o menos 20 a 25 ml por placa.
5. Controlar la esterilidad colocando el medio envasado en una incubadora a 37°C por 24 hrs.
6. Mantener el medio envasado en la refrigeradora hasta el momento de usarlo.

AGAR DE MAC CONKEY CON SORBITOL

Medio diferencial para el cultivo y aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 asociada con las epidemias de colitis he- morrágica.

Fórmula	g/L
Peptona bacteriológica	18.5
Hidrolizado enzimático de caseína	1.5
Sorbitol	10.0
Sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
Agar	13.5

pH 7.1 +_ 0.2

Preparación

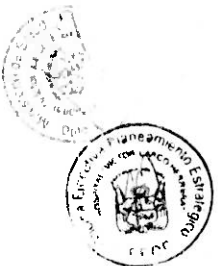
Suspender 50 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, esterilizar a 121 °C por 15 min, mezclar bien y distribuir.

Descripción

Medio selectivo y diferencial para el aislamiento y desarrollo de *Escherichia coli* serotipo O157:H7, agente causal de la colitis hemorrágica y asociado estrechamente con el Síndrome Urémico Hemolítico¹.

Su formulación fue descrita por Rappaport y Hening en 1952², y recomendado específicamente para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 enteropatógeno, no fermentador de sorbitol. March y Ratnam demostraron la idoneidad del medio Agar de Mac- Conkey con sorbitol para identificar *Escherichia coli* O157:H7, y comprobaron su elevada sensibilidad y especificidad³.

Las colonias de la mayoría de las especies de *Escherichia coli* se tornan de color rosa, pues fermentan el sorbitol, no ocurriendo así para *Escherichia coli* O157:H7 que desarrolla colonias incoloras.



Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

Control de la Calidad

Microorganismo	Crecimiento	Color de las colonias
CONTROL POSITIVO		
Escherichia coli	bueno	incoloras
Escherichia coli	bueno	rojo
CONTROL NEGATIVO		
Enterococcus faecalis	de inhibido a escaso	de rosa pálido a oscuras, si las hay

AGAR CITRATO

Medio para la diferenciación de enterobacterias basada en la utilización del citrato como única fuente de carbono.

Fórmula	g/L
Sulfato de magnesio	0.2
Fosfato de amonio dihidrógeno	0.2
Fosfato de amonio sódico	0.8
Citrato de sodio tribásico	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Azul de bromotimol	0.08
Agar	15.0

pH 6.7 +_ 0.2

Preparación

Suspender 23 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C por 15 min. Solidificar en posición inclinada.

Descripción

Este medio es fundamentalmente la forma sólida del medio que Koser¹, en 1923, desarrolló como un medio líquido constituido por sales inorgánicas, en el cual la sal de amonio es la única fuente de nitrógeno, y el citrato, la única fuente de carbono para diferenciar entre Escherichia coli y Enterobacter aerogenes. Este medio presentaba, como desventaja, la falsa apariencia de crecimiento observada cuando se utilizaban inóculos grandes. Simmons², en 1926, modificó la formulación de Koser con la adición de 1.5 % de agar y azul de bromotimol. Este medio cumple con las recomendaciones de la American Public Health Association (APHA)³.

El medio también puede ser distribuido en placas, inoculando su superficie por estría. Si se distribuye en tubos, el fondo se inocula por punción y la superficie por estría. En ambos casos el medio inoculado se incuba durante 48 horas a 35 +_ 2 °C.

El crecimiento positivo en el medio está dado por la utilización del citrato, lo que provoca una reacción alcalina y el cambio de color del medio de verde a azul oscuro. En caso de no utilizar el citrato el medio permanece sin cambio.



Control de la Calidad

Microorganismo	Crecimiento
Citrato positivo:	Positivo:
Citrobacter	Medio de cultivo
Enterobacter	azul oscuro
Salmonella Paratyphi	
B Salmonella Enteritidis Salmonella	
Typhimurium Arizona	
Klebsiella	

AGAR SALMONELLA SHIGUELLA

Composición:

- Extracto de carne	5 g
- Proteosa peptona	5 g
- Lactosa	10 g
- Sales biliares	8.5 g
- Citrato de sodio	8.5 g
- Tiosulfato sódico	8.5 g
- Citrato férrico	1.5 g
- Agar	13.5 g
- Verde brillante	0.00033 g
- Rojo neutro	0.025 g

pH 7.3 +_ 0.2

Preparación

Suspender 57.9 g en 1 L de agua destilada o desionizada, calentar con agitación frecuente y hervir a fuego lento durante 2 min. EVITAR CUALQUIER SOBRECALENTAMIENTO. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Enfriar hasta 45-50 °C y distribuir.

Descripción

El Agar S.S. es esencialmente una modificación del medio Agar Desoxicolato-Citrato descrito por Leifson1 en 1935. Es un medio diferencial y selectivo para el aislamiento de especies de Shigella y Salmonella a partir de muestras patológicas, muestras de alimentos sospechosas y otras. Los organismos coliformes y el resto de la flora acompañante se inhiben considerablemente por el verde brillante, las sales biliares y la elevada concentración de tiosulfato y citrato.

Con la presencia del tiosulfato y de los iones de hierro, se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las colonias de Proteus y de algunas especies de Salmonella. Las colonias de coliformes se identifican por la degradación de la lactosa a ácido, lo que se evidencia por el cambio del indicador de pH rojo neutro.



Las colonias de gérmenes lactosa negativos son incoloras y las de gérmenes lactosa positivos son rosadas hasta rojas. Los microorganismos formadores de sulfuro de hidrógeno proporcionan colonias incoloras con centro negro.

La superficie del medio de cultivo se inocula por estrías con el material de muestra o con el procedente de un cultivo de enriquecimiento previo, por ejemplo, Caldo Selenito.

Las placas inoculadas se incuban de 18 a 25 horas a 35 ± 2 °C.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

AGAR UREA

Base destinada a la preparación del medio de Christensen para la diferenciación de microorganismos, especialmente bacilos entéricos, por la capacidad de hidrolizar la urea.

Fórmula	g/L
Peptona bacteriológica	1.0
Dextrosa	1.0
Fosfato monopotásico	0.8
Fosfato disódico	1.2
Cloruro de sodio	5.0
Rojo fenol	0.012
Agar	15.0

pH 6.8 ± 0.2

Preparación

Suspender 2.4 g en 95 mL de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, esterilizar a 115 °C por 20 min, enfriar hasta 50 °C y adicionar asépticamente 5 mL de una solución de urea estéril al 40 %. Mezclar bien, distribuir en tubos estériles y solidificar en posición inclinada.

Descripción

El medio Agar Urea fue creado por Christensen¹ para la diferenciación de los bacilos entéricos por su capacidad para hidrolizar la urea.

El medio se inocula a partir de un cultivo puro sobre la superficie de un agar inclinado. Los organismos que utilizan la urea provocan un cambio en el color del medio a rosado intenso debido a la alcalinización del medio por la formación de amonio. Esta reacción se completa en un período de 3 a 5 horas.



Para la preparación de este medio se suministra una solución de urea al 40 % esterilizada por filtración. Los tubos de Agar Urea se incuban de 18 a 24 horas a una temperatura de 35 ± 2 °C.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

Control de la Calidad

Microorganismo Color del medio Urea

CONTROL POSITIVO

Proteus vulgaris rosado intenso +

MEDIO T.C.B.S.

Medio para el cultivo y aislamiento selectivo de vibrios patógenos a partir de materiales clínicos, aguas y alimentos.

Fórmula	g/L
Peptona bacteriológica	10.0
Extracto de levadura	5.0
Sacarosa	20.0
Bilis de buey	8.0
Tiosulfato de sodio	10.0
Citrato de sodio tribásico	10.0
Citrato férrico	1.0
Cloruro de sodio	10.0
Azul de bromotimol	0.04
Azul de timol	0.04
Agar	14.0

pH 8.6 ± 0.2



Preparación

Suspender 88 g en 1 L de agua destilada o desionizada, calentar hasta la ebullición. Evitar cualquier sobrecalentamiento. No esterilizar en autoclave, ni refundir. Enfriar hasta 45-50 °C y distribuir.

Descripción

La mayoría de las enterobacterias que se encuentran en las heces quedan suprimidas totalmente durante al menos 24 horas, excepto las especies de *Proteus* y *Enterococcus faecalis*, las cuales pueden producir un ligero crecimiento, diferenciándose fácilmente sus colonias de las de *Vibrio*.

Las heces o el material contaminado se inocula por estrías en la superficie del medio.

Características de las colonias después de 24 horas a 35 ± 2 °C.

Microorganismo

- Vibrio cholerae* y el tipo El Tor
- Vibrio alginolyticus*
- Vibrio parahaemolyticus*
- Proteus* sp.
- Enterococcus* sp.
- Pseudomonas* sp.

Características de las colonias

- amarillo-pardas, de 2-3 mm de diámetro
- amarillas, de 3-5 mm de diámetro
- verde-azules con centro verde, de 3-5 mm de diámetro
- amarillo-verdes, de 1 mm de diámetro
- amarillas, de 1 mm de diámetro
- verde-azules, de 1 mm de diámetro

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

Control de la Calidad

Microorganismo

Crecimiento

Color de las colonias

CONTROL POSITIVO

Vibrio cholerae sp.

bueno

amarillo

CONTROL NEGATIVO

Escherichia coli ATCC 25922

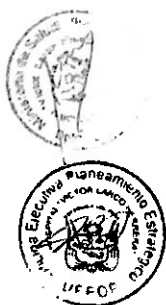
de inhibido a escaso

translúcidas, si las hay

THAYER-MARTIN MODIFICADO

Composición:

- Agar 10 g
- Medio base para gonococos (GC) 36 gr
- Hemoglobina 10 g
- Suplemento nutritivo 10 ml
- Solución de antibióticos 10 ml
- Agua destilada 1000 ml
- pH final 7.2 +/- 0.2 a 25 °C



Preparación:

1. En un matraz de 250 ml colocar 125 gr de Agar salmonella shiguelia en 1000 de agua destilada fría.
2. Calentar hasta punto de hervor para disolverlo por completo.
3. Repartir el medio placas Petri, más o menos 20 a 25 ml por placa.
4. IMPORTANTE: No se debe esterilizar en autoclave

MEDIO FLUIDO TIOGLICOLATO

Medio para el cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios en la realización de los ensayos de esterilidad.

Fórmula	g/L
Hidrolizado enzimático de caseína	15.0
Extracto de levadura	5.0
Dextrosa	5.5
Cloruro de sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5
L-cistina	0.5
Resazurina sódica	0.001

pH 7.1 \pm 0.2 0.1

Preparación

Suspender 29 g en 1 L de agua destilada o desionizada. Calentar agitando frecuentemente y hervir hasta disolución completa. Mezclar bien y distribuir en tubos. Esterilizar a 121 °C por 15 min.

Descripción

El medio tioglicolato fue descrito y diseñado originalmente por Brewer¹. Más adelante Vera incorpora la peptona de caseína con el fin de aumentar la capacidad nutricional del medio de cultivo. La composición fue adoptada por la Farmacopea de Estados Unidos (USP), el AOAC y la Farmacopea Europea (EP) y se emplea específicamente en procedimientos cualitativos para pruebas de control de esterilidad. El medio también es utilizado ampliamente como medio de enriquecimiento en microbiología clínica, en especial para muestras de zonas corporales, principalmente para el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluso los nutricionalmente exigentes, entre los que se incluyen bacterias



grampositivas, gramnegativas, aerobias, anaerobias, microaerófilas y hongos presentes en una extensa diversidad de muestras.

Entre sus ingredientes, el extracto de levadura, el hidrolizado enzimático de caseína y la glucosa proveen los factores necesarios para el crecimiento y la multiplicación bacteriana. El tioglicolato de sodio y la L-cistina son agentes reductores que proporcionan una suficiente anaerobiosis, previenen la acumulación de peróxidos, que son letales para algunos microorganismos y debido a los grupos -SH- de estos compuestos se neutralizan los efectos bacteriostáticos y tóxicos de los preservativos mercuriales, arsenicales y de otros metales pesados.

La siembra se realiza en dependencia de la muestra a analizar:

- Muestras líquidas: agregar 1 ó 2 gotas de la muestra a tubos conteniendo medio de cultivo.
- Tejidos y otras muestras sólidas: macerar en caldo estéril. Luego sembrar de la misma manera que para muestras líquidas.
- Hisopos: insertarlos en el medio de cultivo, luego de haber sembrado el medio sólido apropiado.
- Si se utiliza para el aislamiento de patógenos a partir de muestras clínicas, subcultivar una porción de 10 – 50 µL del medio incubado en Agar Sangre Columbia o Agar Triptona Soya suplementado con 5 % de sangre.

Interpretación de los resultados

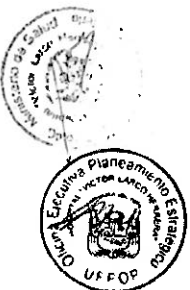
Después de la incubación, el crecimiento microbiano se demuestra por la presencia de turbidez en los tubos. Los microorganismos aerobios estrictos crecen en la parte superior del medio.

Los microorganismos anaerobios facultativos crecen en todo el medio de cultivo.

Los microorganismos anaerobios estrictos crecen en las profundidades del medio de cultivo

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: debe conservarse a temperatura ambiente, en lugar protegido de la luz y de fuentes de calor.



AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO (TSI)

Composición:

- Extracto de carne	3 g
- Extracto d levadura	3 g
- Peptona	15 g
- Proteosa peptona	5 g
- Lactosa	10 g
- Sacarosa	10 g
- Glucosa	1 g
- Sulfato ferroso	0.2 g
- Tiosulfato d sodio	0.3 g
- Agar	13.5 g
- Rojo de fenol	0.024 g
- Cloruro d sodio	5 g

Preparación

Suspender 60 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C por 15 min. Solidificar en posición inclinada para obtener un fondo de aproximadamente 2,5 cm de longitud.

Descripción

En 1917 Krumweide y Kohn modificaron el Agar con dos azúcares de Russell mediante la adición de sacarosa. Esto permite una rápida detección de organismos coliformes que degradan la lactosa lentamente y no así la sacarosa¹. Sulkin y Willet² en el año 1940 desarrollaron un medio de tres azúcares y sulfato ferroso para la identificación de organismos entéricos. Hajna³ también describió un medio similar con los mismos propósitos.

El Agar Tres Azúcares y Hierro es un medio compuesto que se utiliza para la diferenciación de enterobacterias por la capacidad que tienen los microorganismos de fermentar la sacarosa, lactosa y dextrosa y por la producción de H₂S. La fermentación de estos carbohidratos se detecta por un cambio visible del color del indicador de pH rojo fenol a amarillo, la producción de H₂S puede detectarse por un ennegrecimiento en el fondo del tubo.

Para algunas especies de *Proteus* debe emplearse este medio en paralelo con el Agar Urea, ya que la respuesta de las mismas es similar a la de las especies de *Salmonella* y *Shigella*, diferenciándose por su capacidad de hidrolizar la urea.

En la actualidad, para la detección de enterobacterias, productoras de gas sulfhídrico, se recomienda el intercambio de éste con el medio de Kligler, ya que el Agar Tres Azúcares y Hierro no es adecuado para la detección de H₂S por los organismos fermentadores de la sacarosa, tales como *Proteus* y *Citrobacter*, debido a que la degradación de dicho azúcar enmascara el efecto del indicador de sulfhídrico⁴.

El medio Agar Tres Azúcares y Hierro es de un valor especial cuando se combina con medios en placas como Agar de MacConkey, Agar S.S., Agar Desoxicolato, La técnica descrita para el uso de este medio, consiste en picar una colonia aislada de la superficie de un medio selectivo en placa, y extenderla en una placa de Agar de MacConkey. Se incuba la placa durante 18 horas a 35 ± 2 °C y se inoculan en paralelo



dos tubos, el primero con Agar Tres Azúcares y Hierro punzando el fondo y extendiendo sobre la pendiente, y el segundo con Agar Urea, estriando la superficie de la cuña. Ambos tubos se incuban a 35 ± 2 °C. Después de 5 horas y luego a las 18 horas, se observa el Agar Urea para detectar si hay hidrólisis de la urea, la cual se aprecia por la coloración rosada intensa del medio. Esto confirma la presencia de especies de *Proteus* y otros organismos. Si no tuvo lugar la hidrólisis de la urea, se observa el tubo de Agar Tres Azúcares y Hierro a las 18 horas, y después a las 48 horas, siendo las reacciones típicas las siguientes:

Microorganismo	Fondo	Pendiente	Gas	H ₂ S
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A	A	+	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	A	A	+	-
<i>Escherichia coli</i>	A	A	+	-
<i>Proteus vulgaris</i>	A *	A	+	+
<i>Morganella morganii</i>	A	NC ó R	-/+	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	A	NC ó R	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	A	NC ó R	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	A	NC ó R	-	-
<i>Salmonella Typhi</i>	A	NC ó R	-	-
<i>Salmonella Enteritidis</i>	A	NC ó R	+	+
<i>Salmonella Typhimurium</i>	A	NC ó R	+	+

A = ácido (amarillo)

NC = no cambio

R = alcalino (rojo)

(+) = positivo

(-) = negativo

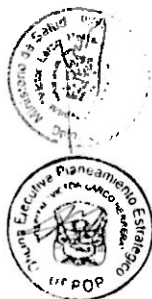
* algunas cepas: R, posiblemente sin producción de gas

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

Control de la Calidad

Microorganismo	Fondo	Pendiente	Gas	H ₂ S
CONTROL POSITIVO				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	A	A	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NC ó R	R	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	A	NC ó R	+	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	A	R	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	A	A	+/-	+



AGAR LISINA Y HIERRO

Medio diferencial para la detección de enterobacterias, especialmente Salmonella y Arizona, basada en la descarboxilación de la lisina, formación de sulfuro de hidrógeno y fermentación de la dextrosa.

Fórmula	g/L
Peptona bacteriológica	5.0
Extracto de levadura	3.0
Dextrosa	1.0
L-lisina	10.0
Citrato férrico amónico	0.5
Tiosulfato de sodio	0.04
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	14.5

pH 6.7 +_ 0.2

Preparación

Suspender 34 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C por 15 min. Solidificar en posición inclinada para obtener una pendiente de fondo profundo.

Descripción

Edwards y Fife (1961) crearon el medio Agar Lisina y Hierro para la detección de los organismos que puedan fermentar rápidamente la lactosa, especialmente cultivos de Arizona¹. Entre los grupos reconocidos de enterobacterias que regularmente descarboxilan la lisina de forma rápida y producen H₂S en grandes cantidades se encuentran las Salmonella y Arizona.

La L-lisina (monoclorhidrato) se utiliza como sustrato para la detección de las enzimas lisina-decarboxilasa y lisina-desaminasa. Los cultivos que descarboxilan la lisina rápidamente provocan una reacción alcalina (color púrpura en todo el medio) o una reacción neutra en el fondo del medio. Los organismos que no descarboxilan la lisina producen una pendiente alcalina (color púrpura) y un fondo ácido (color amarillo). Los cultivos que producen H₂S provocan un ennegrecimiento intenso



en el medio. Los microorganismos que desaminan la lisina (cultivos de *Proteus* y *Providencia*) producen una pendiente roja profunda sobre un fondo ácido (color amarillo).

Cultivo	Fondo	Pendiente	H2S
Salmonella	K	K	+
Proteus	A	R	-
Providencia	A	R	-
Citrobacter	A	K	+
Escherichia	A ó K	K	-
Shigella	A	K	-
Klebsiella	K	K	-

A = ácido (amarillo)

(+) = positivo

K = alcalino, sin cambio (púrpura)

(-) = negativo

R = desaminasa de lisina (rojo)

El Agar Lisina y Hierro se inocula punzando con una aguja recta hasta la base del fondo y sembrando en estría la superficie de la pendiente. Los tapones de los tubos no deben ajustarse para garantizar las condiciones aerobias sobre la pendiente. Los tubos se incuban de 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

Control de la Calidad

Microorganismo	Fondo	Pendiente	H ₂ S
CONTROL POSITIVO			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	A ó K	K	-
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	K	K	+
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	A	K	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	A	R	-



MEDIO SIM

Medio para la diferenciación de enterobacterias basada en la producción de sulfuro de hidrógeno, formación de indol y motilidad.

Fórmula	g/L
Hidrolizado enzimático de caseína	20.0
Peptona bacteriológica	6.1
Tiosulfato de sodio	0.2
Sulfato amónico ferroso	0.2
Agar	3.5

pH 7.3 +_ 0.2

Preparación

Suspender 30 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa, distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C por 15 min.

Descripción

El medio SIM está destinado a la diferenciación de las enterobacterias, especialmente Salmonella y Shigella, basada en tres reacciones específicas: producción de sulfuro de hidrógeno, formación de indol y motilidad.

La composición del medio fue especialmente diseñada para favorecer estas reacciones. El tiosulfato de sodio y el sulfato amónico ferroso sirven de indicadores de H₂S.

El gas sulfhídrico es producido por las bacterias reductoras del sulfato. Posteriormente ocurre la reacción del sulfato de amonio ferroso con el H₂S dando lugar a sulfato de hierro, el cual se forma a lo largo de la línea de inoculación en forma de precipitado de color negro.

La composición del medio SIM, específicamente en su contenido de agar (0,35 %), garantiza que sea catalogado como semisólido, lo que permite la detección de la motilidad para los organismos móviles, observándose la difusión de la turbiedad alrededor de la línea de incubación. A su vez, los microorganismos no móviles presentan el crecimiento estrictamente sobre la línea de inoculación. Generalmente la difusión de la turbiedad ocurre en todo el medio. Sin embargo, en ocasiones, se puede observar el crecimiento en forma de abanico o nodular.

Después de observar la motilidad y la producción de sulfuro de hidrógeno, se le adiciona al medio 0,2 mL de reactivo de Kovac's, dejándolo por 10 min. La aparición de una coloración roja intensa indica la reacción positiva al indol proveniente del aminoácido esencial triptófano incorporado al



medio con el hidrolizado enzimático de caseína. No cambio de la coloración original del reactivo indica la reacción negativa al indol.

Este medio está recomendado por APHA para el análisis de los alimentos³.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

Control de la Calidad

Microorganismo	H2S	Indol	Motilidad
Escherichia coli ATCC 25922	-	+	+
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	+	-	+
Salmonella Typhi ATCC 19430	-	-	+
Shigella sonnei ATCC 25931	-	-	-
Proteus vulgaris ATCC 13315	+	+	+

AGAR MALTOSA DE SABOURAUD

Medio para el cultivo de hongos filamentosos y levaduras.

Fórmula	g/L
Peptona bacteriológica	5.0
Hidrolizado enzimático de caseína	5.0
Maltosa	40.0
Agar	15.0

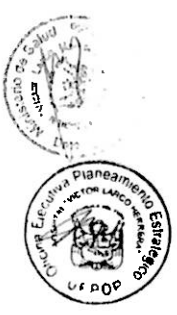
pH 5.6 +_ 0.2

Preparación

Suspender 65 g en 1 L de agua destilada o desionizada, hervir hasta disolución completa y esterilizar a 121 °C por 15 min. Evite el calentamiento en exceso que podría dar lugar a un medio de agar más blando.

Descripción

El Agar Maltosa de Sabouraud fue descrito por Sabouraud para el cultivo de hongos¹. A diferencia del Agar Dextrosa de Sabouraud, el hidrato de carbono que se le incorpora es la maltosa. Esta última y el extracto de malta son ampliamente utilizados para el cultivo de mohos y levaduras. El bajo valor



de su pH, de aproximadamente 5.6, favorece el crecimiento de los hongos y es inhibitorio para la flora bacteriana y algunas especies de hongos^{2,3,4}. Este medio puede utilizarse con antibióticos y otras sustancias inhibitorias para el cultivo selectivo de varios grupos de microorganismos.

El medio inoculado se incuba como mínimo durante 3 días a 25 ± 2 °C.

Almacenamiento

- Medio deshidratado: de 15 a 30 °C
- Medio preparado: de 2 a 8 °C

Control de la Calidad

Microorganismo Crecimiento

CONTROL POSITIVO

Candida albicans ATCC 26790 bueno

Candida albicans ATCC 10231 bueno

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 bueno

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9080 bueno

CONTROL NEGATIVO

Medio no inoculado

D. MEDIOS DE TRANSPORTE

MEDIO DE CARY BLAIR

Composición:

- | | |
|-------------------------|-------|
| - Fosfato disódico | 1.1 g |
| - Cloruro de sodio | 5.0 g |
| - Tioglicolato de sodio | 1.5 g |
| - Agar | 5.0 g |
| - Agua destilada | 991 g |
| - PH | 8.4 |

Preparación

1. Colocar los ingredientes en un balón con agua destilada.
2. Calentar en baño María hasta que la solución esté clara (no se permite que hierva)



3. Enfriar a 50°C. Agregar 9 ml de solución de cloruro de calcio al 1% recién preparada y ajustar el pH a 8.4 con NaOH 10N gota a gota.
4. Colocar cantidades de 5 a 7 ml en tubos con tapas rosca (aflojado) estériles de 13 x 100 mm.
5. Esterilizar (no en autoclave) a 100°C en baño maría hirviendo durante 15 minutos. Se aprietan las tapas después de la esterilización.
6. Almacenar en un lugar fresco y oscuro y no permitir que se seque.

6.2.3 HEMOCULTIVOS

Principios generales:

- Es la prueba más útil y más frecuentemente usada para demostrar la presencia de bacterias en la corriente sanguínea, ya que el Dx de los estados septicémicos se basa en el aislamiento del germen responsable presente en la sangre circulante.

DETERMINACION EXACTA Y OPORTUNA DE LA BACTERIEMIA Y LA FUNGEMIA.

- Identificación y aislamiento del germen.
- Determinar susceptibilidad antibiótica.
- Deben obtenerse antes de la terapia antibiótica.
- Tomar muestra en el momento en que la temperatura del paciente se encuentre elevada.
- Se requiere un mínimo de tres hemocultivos seriados por proceso séptico.

A diferencia de otras muestras que son enviadas al laboratorio de Microbiología, las variables prelaboratorio (preanalíticas) van a afectar:

- El grado de recuperación de microorganismos
- El porcentaje de contaminación.
- La interpretación de los resultados por el Médico.

POR LO TANTO, ES DE VITAL IMPORTANCIA UNA APROPIADA COLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.

La detección de la bacteriemia y la fungemia constituye una de las prioridades del Servicio de Microbiología Clínica, dada su importancia diagnóstica y pronóstica ya que se asocia con una elevada mortalidad. Se define como **bacteriemia** la presencia de bacterias en la sangre que se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en los hemocultivos. El término **fungemia** se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre. **Septicemia** y **sepsis** son expresiones que se emplean para denominar el síndrome clínico con el que habitualmente se manifiestan las bacteriemias o las fungemias, independientemente del resultado de los hemocultivos.

6.2.4.1 Fundamento



Sería imposible detallar todas las situaciones en las que se deben extraer hemocultivos, pero, de forma general, deben realizarse, antes de la administración de la terapia antimicrobiana sistémica, siempre que exista sospecha clínica de sepsis, meningitis, osteomielitis, pielonefritis, infección intraabdominal, artritis, infecciones graves de la piel y tejidos blandos, neumonía, endocarditis y fiebre de origen desconocido (absceso oculto, fiebre tifoidea, brucelosis, tularemia, etc.). Los signos que orientan esta sospecha incluyen fiebre o hipotermia (neonatos, ancianos), escalofríos, leucocitosis o granulocitopenia, deterioro uni o multiorgánico de etiología no aclarada, shock, compromiso hemodinámico de causa desconocida y combinaciones de algunos de ellos. La extracción de hemocultivos está indicada, asimismo, en niños pequeños o ancianos con disminución súbita de la vitalidad, ya que en estas poblaciones pueden no presentarse los signos y síntomas típicos de la bacteriemia.

El procesamiento de los hemocultivos constituye una de las **prioridades** del Servicio de Microbiología Clínica.

- Pacientes con fiebre $\geq 38^{\circ}$ C o cuya temperatura sea inferior a 36° C.
- Pacientes con leucocitosis o leucopenia.
- Pacientes con trombopenia o alteraciones de la coagulación de causa no filiada.
- Pacientes con infección focal de etiología no aclarada.
- Pacientes con deterioro uni o multiorgánico, shock o inestabilidad hemodinámica.
- Neonatos ante la mínima sospecha de infección.

El cultivo de la sangre debe complementarse con el de otros fluidos como líquido cefalorraquídeo, orina, muestras del tracto respiratorio inferior o líquido sinovial en pacientes con sospecha de meningitis, pielonefritis, neumonía o artritis séptica, respectivamente.

Rendimiento del hemocultivo:

- Tiempo crítico de la toma de la muestra.
- Volumen de sangre.
- Empleo de medios de cultivo apropiados.
- Terapia antibiótica.

6.2.4.2 Documentos de consulta

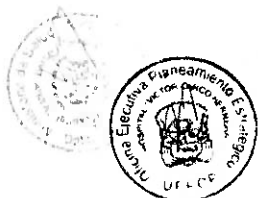
- ✓ Cuadernos de Registro de hemocultivos.
- ✓ Normas I.N.S. de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos.
- ✓ Normas de bioseguridad.

6.2.4.3 Toma de la muestra

Indicaciones:

Las indicaciones para la obtención de cultivos de sangre son múltiples, pero básicamente lo son:

- Un cambio súbito de la frecuencia de pulso y la temperatura, acompañado o no de escalofríos, postración o hipotensión.
- Una historia de fiebre leve, intermitente y persistente, asociada con un soplo cardíaco.
- Cualquier sospecha de sepsis.



- Fecha y hora de recepción de la solicitud.
- Pago respectivo por caja, trámite PP o exonerado.
- Datos completos legibles.
- Dx. Presuntivo.
- Germen sospechado.
- Uso o no atb.

Elección del medio para hemocultivo:

- Depende del microorganismo que se desee aislar.
- Medios generales:
 - Medio monofásico: Caldo Trypticase soya o Infusión cerebro corazón (45ml, 20ml)
 - Infusión cerebro corazón con agar, permite desarrollo de bacterias aerobias como anaerobias.
 - Caldo de Tioglicolato para bacterias anaerobias.
 - BACTEC 9050(caldo de digerido de soya-caseína con resinas).
- Elegir de acuerdo a la edad del paciente
 - Medios BACTEC Plus Aerobic/Anaerobic
 - BACTEC PEDS Plus
- Control de la calidad del medio.

Medidas generales:

- Ratificar que solicitud corresponda al paciente.
- Registrar T° del paciente en ese momento.
- Anotar en la orden: responsable, fecha, hora.
- ROTULAR frasco.
- Posición del paciente.

Técnica de punción venosa para cultivo de sangre con una aguja estéril y jeringa:

Definición: El método de hemocultivo consiste en obtener sangre con la más rigurosa técnica de asepsia y añadirla a un frasco que contiene medio de cultivo.

Objetivo:

- Realizar una técnica aséptica, libre del riesgo de contaminar la muestra.
- Servir de apoyo diagnóstico oportuno y eficaz.

A. Preparación del material

En una bandeja se preparará:

- Una ligadura.
- Un recipiente con algodón.
- Un frasco con solución yodada y algodón impregnado en alcohol de 70 °.
- Una jeringuilla desechable de 10 ml de capacidad con su correspondiente aguja I.V.
- Medio para hemocultivo.



- Jeringa 10cc, 5cc, 3cc. D/C. 2 agujas D/C.
- Guantes estériles.
- Alcohol, algodón.
- Alcohol yodado, yodopovidona. Los antisépticos deben ser repartidos en alícuotas pequeñas para el uso en el día

Procedimientos generales:

Para minimizar el riesgo de contaminación de hemocultivos: **TODA PRECAUCIÓN ES BUENA.**

1. Lavado de manos.
2. Uso de mascarilla.
3. Uso de mandilón.
4. Uso de guantes estériles.

B. Obtención de la sangre

Momento y lugar de la extracción. - Se extraerán 1-3 hemocultivos con el menor intervalo de tiempo posible después de la aparición de los síntomas utilizando lugares de venopunción diferentes.

Procedimientos específicos:

1. Ubicación de la zona para flebotomía.
2. Asepsia de manos y uso de guantes estériles.
3. Aplicar ligadura.
Colocar la ligadura al paciente tras elegir la vena a pinchar. Tras ello se limpia con un algodón impregnado en alcohol de 70° una zona de la piel de un diámetro de 3-5 cm en el lugar elegido para la palpación y los dedos del explorador. Dejar actuar al menos 1 minuto.
4. Asepsia de zona de flebotomía:
Pintar ampliamente con povidona la piel de la zona a pinchar (al menos en un diámetro de 10 cm). A continuación, se pintarán las yemas de los dedos índice, medio y pulgar de la mano utilizada para la palpación de la vena. El efecto de la povidona no se ejerce de modo total hasta que transcurre el tiempo suficiente para su oxidación (secado en forma rotatoria, centrífuga y cambiar el algodón cada vez que se vuelva a pasar que el antiséptico actúe por lo menos 2' (1'30"), seco.
5. Retirar el tapón a presión del frasco BACTEC: Levantar la lengüeta plástica de los frascos y limpiar los tapones con un algodón impregnado en solución yodada.
6. Desinfección del diafragma del frasco de hemocultivo con alcohol al 70% o alcohol yodado: frascos BACTEC no usar yodóforos.
7. Realizar flebotomía:
 - El émbolo llenar todo espacio dentro de la jeringa, para evitar presencia de aire contaminante.
 - Entrar en piel con la aguja a 30 – 45°, por debajo del lugar visible o palpable de la vena: evita pasar sobre la vena y sangrado externo.
 - Colocar la aguja sobre la vena y empujar firme y deliberadamente hacia arriba. Mantener fijada la vena y la guja debe estar paralela a ésta.



- Una vez que se ha penetrado en la vena, sacar la sangre aspirando con el émbolo lenta y sostenidamente
 - Es correcta la utilización del sistema Vacutainer para la extracción de los hemocultivos, teniendo la precaución de extraer los frascos de hemocultivos antes que cualquier tubo para otros fines, ya que se puede contaminar la aguja del sistema Vacutainer y por consiguiente los hemocultivos extraídos con posterioridad
8. Extraer sangre la cantidad necesaria:
- | | |
|------------------------|--------------------------|
| • 10 – 30 cc adultos. | proporción recomendada: |
| • 1 – 5 cc niños | Sangre: caldo de cultivo |
| • 1 – 2 cc lactantes | 1: 5 |
| • 0.5 – 1 cc neonatos. | 1: 10 |
9. Luego de obtener la cantidad deseada de sangre, soltar la ligadura.
10. Retirar la aguja de la vena sin aplicación de algodón sobre la misma, y colocar un pedazo de algodón sobre el sitio de punción.
11. Cambiar de aguja (variable).
12. Inoculación de la muestra de sangre al medio de cultivo a través del diafragma: inmediatamente obtenida la muestra para evitar que se coagule.
13. Mezclar el contenido inclinándolo suavemente 2 – 3 veces.
14. Descartar la aguja y la jeringa en un contenedor resistente a las punturas. No volver a introducir la aguja en su funda.
15. Limpiar la tapa del frasco.
16. Indicar en el rótulo el N° de hemocultivo: el N° de historia, nombre del PACIENTE y el número de extracción realizada (1º, 2º o 3º), teniendo la precaución de no tapar la etiqueta de código de barras del frasco.
17. Transportar el hemocultivo inmediatamente al laboratorio, colocado en un recipiente secundario apropiado para su transporte, para evitar cualquier derrame.
En caso de usar medio BACTEC llevar al laboratorio de Microbiología para que éste sea introducido al equipo BACTEC, o guardar a temperatura ambiente en lugar seguro, limpio y seco, hasta que lo último pueda ser posible.

C. Envío de los hemocultivos al laboratorio

- 1.- Se rellenará una solicitud para cada extracción. Es absolutamente necesario indicar en la solicitud el nombre del paciente, el servicio donde se encuentra ingresado, el número de cama y el solicitante con objeto de informar los resultados preliminares en caso de positividad. Sería deseable añadir en la solicitud otra información que ayudará a la valoración de la bacteriemia en el laboratorio como si está recibiendo tratamiento antibiótico, la enfermedad de base del paciente, el síndrome clínico que padece en el momento actual y si la infección es de adquisición nosocomial o comunitaria.
- 2.- Los frascos de cada paciente con su solicitud se enviarán inmediatamente al Servicio de Microbiología, donde se introducirán en una estufa a 35-37°C. Nunca deben dejarse en Refrigeradora.

D. Recepción y registro de los hemocultivos

El personal del laboratorio procederá de la siguiente forma:



- 1- Comprobar que cada frasco llegue acompañada de su solicitud correspondiente y que coincidan los datos que figuran en la solicitud y en los frascos.
- 2- Asignar a cada extracción, bien sea de dos o un solo frasco, un número correlativo del registro general. Dicho número se anotará en la solicitud y en el frasco o frascos de cada extracción.
- 3- Colocar los frascos por orden numérico y llevarlos al laboratorio de microbiología. Las solicitudes pasarán a Toma de muestra para su registro en el sistema de gestión del laboratorio.
- 4- Aunque existan graves deficiencias en el envío de la muestra, dada la importancia del diagnóstico de bacteriemia, nunca será rechazada. Sin embargo, constará en la información de la solicitud: "Interpretar resultados con precaución...", anotándose el tipo de deficiencia encontrado.

Criterios para rechazar una muestra para HEMOCULTIVO:

- Inadecuada temperatura de transporte.
- Demora en el envío al laboratorio (por encima del coordinado).
- Muestra sin rotular o mal rotulada, o no concuerda con solicitud.
- Muestra con evidencias de haberse contaminado o derramado o deteriorado.

De la Preparación de MEDIOS DE HEMOCULTIVO:

Medio líquido (I.N.S.)

- Pesar 30 gr de caldo tripticasa soya y disolver en 1 litro de agua destilada.
- Añadir 0.25 g de polianetol sulfonato de sodio. (SPS al 0.025%)
- Añadir 10 ml de hematina (10 mg/ml) e isovitalex.
- Colocar 20 ml en frasco de 50 ml (niños). Para adultos 40 ml. Cerrar el frasco parcialmente.
- Colocando un tapón de jebe de tipo de liofilizar.
- Envolver la bandeja con los frascos de papel Kraft.
- Esterilizar a 121°C por 15 minutos.
- Colocar 24 horas en la estufa con CO₂.
- Sacar de la estufa e inmediatamente presionar los tapones de jebe para un cierre hermético.
- Controlar por 24 horas a 37 °C y 48 horas a temperatura ambiente Este medio además de demostrar gran recuperación de microorganismos, permite eliminar gran porcentaje de riesgo de contaminación.

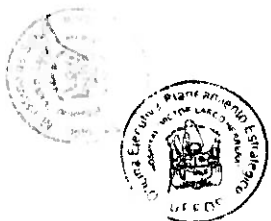
El anticoagulante SPS es el más adecuado debido a que posee 03 características:

- ✓ Antifagocitaria (inactiva la acción de macrófagos y neutrófilos).
- ✓ Inactiva la acción de los antibióticos (kanamicina, gentamicina estreptomycin, polimixina)
- ✓ Inactiva el factor del Complemento.

El suplemento isovitalex eleva el grado de nutrientes del caldo y favorece el desarrollo adecuado de los gérmenes.

La hematina facilita la recuperación fácil del *Haemophilus influenzae*.

Control de calidad del medio líquido para HEMOCULTIVO:



- Inocular un cultivo de *Haemophilus influenzae* en agar chocolate y un cultivo de *Streptococcus pneumoniae* en agar sangre e incubar por 24 horas.
- Hacer una suspensión de cada bacteria e inocularlas en frascos diferentes.
- Incubar a 37° C por 7 días.
- Observar por presencia de crecimiento y subcultivar en medios apropiados a las 24, 48 y a los 7 días.

Medio bifásico

Medio Sólido:

800 ml de agua destilada.
32 gr de agar tripticasa soya.
4 gr de citrato de sodio.
12 gr de agar granulada.

Se funde por ebullición y se reparte en frascos de 125 ml donde se colocan 15 a 20 ml. Se autoclava a 120 °C por 15 a 20 minutos y se deja que solidifique por una de las paredes del frasco. Cuando el medio esté duro, se añade asépticamente el medio líquido.

Medio Líquido:

1000 ml de agua destilada.
30 gr de caldo tripticasa soya o caldo triptosa o infusión cerebro - corazón.
5 gr de citrato de sodio.

Se esteriliza en autoclave a 121° C por 15 a 20 minutos, junto con el medio sólido. Cuando el medio sólido esté solidificado, se añade asépticamente 20 a 25 ml del caldo arriba descrito. Entonces el frasco ya tiene una fase sólida en una de las paredes y una fase líquida en el fondo. Se colocan tapones de jebes.

Controlar la esterilidad del medio a 37 °C por una semana y a temperatura ambiente por una semana más.

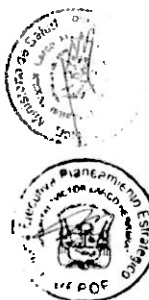
Control de calidad del medio bifásico para HEMOCULTIVO:

Se utilizan cepas de *Brucella* y *Salmonella* por ej. Para verificar si el medio es o no adecuado. Se recomienda que el medio de hemocultivo permita el ingreso de CO₂, ya que las cepas de *Brucella abortus* requieren de éste para su crecimiento primario. Esta es una condición que limita la recuperación de esta especie. En nuestro medio, la mayor parte de los frascos de hemocultivo no cumplen con esta recomendación.

6.2.4 UROCULTIVO

El Urocultivo es el método indicado para el aislamiento e identificación de los agentes etiológicos de infecciones del tracto urinario (ITU).

De la Obtención de la Muestra:



1. Constatar que la solicitud de análisis tenga los datos completos, llenados correctamente con letra legible y con firma del médico solicitante.
2. Que la solicitud esté debidamente sellado y registrado por caja según tarifa vigente o que tenga el trámite de Servicio Social en caso de exoneración o pendiente de pago.
3. No tener terapia previa (72 horas). En casos especiales se realizará el Urocultivo, a pacientes con evolución desfavorable a pesar de estar recibiendo terapia antimicrobiana.
4. Proceder a la obtención de la muestra: Lavar previamente los genitales con agua y savlon. Indicar que al momento de orinar separe los labios vaginales si es mujer, o retraiga el prepucio si es hombre.
Se puede recoger la primera orina de la mañana; pero si no es posible, se recogerá la orina a las 3 horas de haber realizado la última micción (acto de orinar).
Debe recoger la segunda parte de la orina, directamente en el recipiente estéril que se le entrega luego de realizar el lavado de los genitales.
5. En niños pequeños, en los que es difícil que controlen la micción, se le colocará una bolsa estéril (previo lavado de los genitales) y se vigilará continuamente la salida de la orina. Si transcurre una hora sin haber orinado, colocar una nueva bolsa repitiendo todo el proceso.
6. Si desde el momento en que se toma la muestra hasta llevarla al laboratorio de Microbiología para su procesamiento tiene que pasar más de una hora, conservar a 40C para evitar la multiplicación bacteriana, ya que la orina es un excelente medio de cultivo y el tiempo de generación de las bacterias más frecuentemente aisladas es de 20-45 minutos, evitando así falsos resultados positivos.

Del Procesamiento:

1. Agitar el recipiente que contiene la orina, para homogenizarla (ya que las bacterias sedimentan bien por ellas mismas, o bien son arrastradas por la posible existencia de leucocitos; de modo que el resultado del cultivo represente la totalidad de la muestra.
2. Con un asa calibrada (0.001 ml) se siembra una placa de Agar Mac Conkey para aislamiento y selección de bacterias gram negativas; y una placa de Agar Chapman para el aislamiento de Estafilococo. Estas placas se incubarán a 35°C durante 18 hrs.
3. Al mismo tiempo de la siembra, utilizando el asa calibrada se depositará una gota de orina en un recuadro de 1 cm² situado en el centro de un portaobjeto, previamente rotulado con el número de la muestra, con la precaución de que la gota no salga de éste. A la extensión se le hará una tinción de GRAM y se observará con el objetivo de 100x.
4. **Visualización de la tinción de GRAM:**
 - Se observará con el objetivo (X100) diez campos dentro del cm² Le anotará el número de gérmenes para cada campo y se calculará la media aritmética.
 - Si se observan distintos tipos morfológicos y tintos riales se anotará en el protocolo.
 - Para calcular en número de gérmenes por ml que existen en la muestra, se realizará la siguiente operación:



X . 400. 100 Número total /ml
X : Media aritmética de las bacterias observadas en los 10 campos.
400: Representa el número total de campos que existen en un *cm*².
100: Dilución utilizada al utilizar el asa calibrada de 0.001 ml

- Si se observan células epiteliales, se anotará si son escamosas, de transición o renales.

6.2.4.1 Lectura de los cultivos

Placa de Mac Conkey: Se confirmará la pureza o no del cultivo, teniendo en cuenta que al ser un medio selectivo no va a permitir el crecimiento de los cocos gram-positivos, con excepción del enterococo.

El aspecto macroscópico de la colonia nos permitirá diferenciar las bacterias fermentadoras de lactosa de las no fermentadoras, y asimismo establecer una identificación presuntiva de la bacteria causante de la infección urinaria.

Para el recuento de colonias, se multiplicará por el factor 1000 si se utilizó el asa calibrada de 0.001 ml y así se obtendrá el número de bacterias por ml o el número total de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

Cuando se trate de muestras obtenidas por punción vesical (suprapúbica) o de pacientes con trasplante renal hay que valorar cualquier número de gérmenes que existan en la placa.

En caso de que se presenten dos o más tipos de colonias, se procederá a la repetición con una nueva muestra, ya que la existencia de dos o más tipos de gérmenes es indicativa de una posible contaminación.

Placa de Agar Chapman: Si se aísla estafilococo coagulasa negativo, el resultado se valorará con respecto al diagnóstico del paciente y en determinadas circunstancias especiales (inmunodeprimidos, trasplante renal, etc.)

6.2.4.2 Identificación, bioquímica y antibiograma:

Basados en la identificación presuntiva se realizarán las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación correcta.

Para realizar el antibiograma por disco difusión: Tocar 3 - 4 colonias e inocular en un tubo de M—H caldo, previamente rotulado y luego determinar sensibilidad.

6.2.5 COPROCULTIVO

El coprocultivo es el método indicado para el aislamiento e identificación de bacterias enteropatógenas. Estos pertenecen principalmente a la Familia Enterobacteriácea y se reconoce a los géneros Salmonella, Shigella y E. coli y a la Familia Vibrionaceae con los géneros Aeromonas, Plesiomonas y Vibrio.

De la Toma de muestra:

Antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano o después de 3 o 4 días de haberse suspendido para asegurar un buen resultado.



La muestra no debe estar mezclada con orina y debe remitirse al laboratorio antes de las 2 horas de obtenida la muestra.

En el caso de niños lactantes o pacientes con dificultad de movilizarse la muestra consistirá en un hisopado rectal.

En caso que el tiempo de obtención de la muestra y la llegada al laboratorio sea mayor de 2 horas emplear el medio Cary Blair (1 gr de heces / 10 ml de preservativo).

De la Recepción de la Muestra:

1. La muestra debe ser obtenida por hisopado rectal, en un tubo debidamente rotulado (código y nombre del formato adjunto).
2. Comprobar que el formato tenga los datos completos, llenados correctamente con firma del médico solicitante.
3. Constatar que el formato esté sellado y registrado por caja, excepto los de Vigilancia Bacteriológica.
4. Para la Vigilancia Bacteriológica se reciben las muestras tomadas los días lunes de cada semana epidemiológica durante las 24 horas y en los días siguientes, las muestras sospechosas de COLERA y DISENTERICAS.
5. Horario de recepción: De 8 am. a 12 m., todos los días.
6. Codificar con clave "C" y número correspondiente y registrar en el cuaderno respectivo el día en que se recibe la muestra.

Del Procesamiento:

1. PRIMER DÍA

La siembra se hará a partir del medio de transporte respectivo (Cary Blair), depositando en un extremo de la placa para luego hacer las estrías en toda la

Superficie del medio.

Sembrar en Agar XLD, Agar SS, Agar TCBS y Agar Mc (5 años) en estría e incubar por 18 - 24 hrs. a **35 - 37°C**.

Luego colocar la muestra en caldo selenito y en agua peptonada e incubar por 6 a 8 hrs. a **37° C**.

- a) Agar Mac Conkey: Para buscar colonias lactosa positivas, típicas de *E. coli*. Esto permitirá evaluar presencia de la flora coliforme en el paciente. Además, evaluar presencia de EPEC, EHEC y ETEC.
- b) Agar Salmonella-Shigella: Para buscar colonias lactosa negativas (incolores) con o sin producción de H_2S , correspondiendo a presuntas *Salmonella* o *Shigella*, respectivamente.
- c) Agar XLD: Para investigar *Salmonella* y *Shigella*.

2. SEGUNDO DÍA



Seleccionar las colonias sospechosas:

En AGAR XLD:

Salmonella (colonias rojas a veces con punto negro, amarillas con punto negro o completamente negras). *Shigella* (colonias rojas). *Escherichia coli* (colonias amarillas).

En AGAR MC:

Salmonella y *Shigella* (colonias translúcidas e incoloras).
Escherichia coli (colonias rojas).

En AGAR TCBS:

Vibrio cholerae (colonias de color amarillo, redondas, cremosas, ligeramente convexas de 2-4 mm de diámetro).

Las colonias sospechosas serán repicadas en tubos con TSI, LIA, Citrato de Simmons, SIM, Asimismo, la prueba del indol se realiza con reactivo de Kovacs. Luego Incubar por 18 - 24 hrs. a 37 ° C.

Sembrar en Agar SS y XLD a partir del Caldo Selenito y en Agar TCBS a partir del Agua Peptonada. Incubar por 18 — 24 hrs. a 37°C.

3. TERCER DIA

Realizar la lectura y la interpretación bioquímica del TSI, LIA, Citrato, motilidad e indol. Si las pruebas bioquímicas son compatibles con el germen sospechado, se procederá a la Identificación Serológica y al Antibiograma respectivo.

Seleccionar las colonias sospechosas del AGAR SS: *Salmonella* (colonias translúcidas e incoloras, algunas se presentan con bordes incoloros y el centro negro). *Shigella* (colonias translúcidas e incoloras). *E. coli* (colonias rojas).

Del Agar TCBS: *V. cholerae* (colonias amarillas).

Estas colonias sospechosas serán repicadas en los medios diferenciales ya mencionados, sólo si no se han aislado en los medios iniciales.

Las colonias sospechosas de *V. cholerae* son sometidas además a la prueba de oxidasa y al test de la cuerda.

4. CUARTO DIA:

Realizar la lectura de los antibiogramas según tabla de sensibilidad, midiendo los halos de inhibición con regla.

Proceder a la lectura de los medios diferenciales de resiembra y seguir los pasos anteriores hasta su total identificación.

Preparar el resultado con el germen patógeno aislado y su respectivo antibiograma. Los resultados negativos se consignarán así: NEGATIVO a *Vibrio cholerae*, *Shigella* y *Salmonella*. En caso de niños: NEGATIVO a *Vibrio cholerae*, *Shigella* y *Salmonella* y EPEC.

CULTIVO DE SECRECIONES

Materiales y equipos

Pinza estéril



Estufa de 35 a 37°C
Mechero de bunsen
Guantes de látex, mascarilla
Contenedor de material contaminado

Medios de cultivo:

Agar sangre
Agar chocolate
Agar Mc Conkey
Se puede introducir otros medios x ej. Agar Chapman

PROCEDIMIENTO

1. PRIMER DIA CULTIVO

Realizar los cultivos cerca del mechero de bunsen
Utilizar placas con medios de cultivo cuando éstas hayan alcanzado la temperatura ambiente
Seleccionar la porción de la muestra más purulenta o que tenga más sangre
Utilizando un hisopo estéril inocular la muestra en un extremo de la superficie de las placas de medios de cultivo
Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por estrías en 4 cuadrantes de la placa
Luego inocular la muestra al Thioglicolato (TSB), en caso que la muestra venga con hisopo, éste será colocado en TSB.
Incubar las placas con los medios de cultivo a 35-37°C por 24 horas.

FROTIS

Seleccionar la porción más purulenta de la muestra o que contenga sangre.
Suavemente extenderla en la lámina portaobjetos, dejar secar y colorearlo.
Nota: Las muestras de secreción vaginal se realiza examen directo y a la muestra de esputo no son inoculadas en TSB

LECTURA

A las 24 horas.
Si no hubiera crecimiento incubar por 24 horas más.

2. SEGUNDO DIA

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA: COCOS GRAM (+) Y BACILOS GRAM (-)

COCOS GRAM (+):

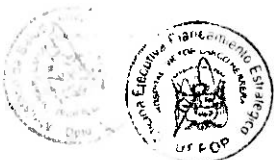
Determinar si en aislamiento es estafilococo, estreptococo, enterococo. Esta identificación se realiza en base a la morfología de la colonia, tipo de hemólisis, forma de las bacterias por coloración Gram a partir de un cultivo y realizar la prueba de reacción a la catalasa y la prueba de coagulasa.

Nota: Al coger la colonia con el asa de siembra tener cuidado de no arrastrar algo de Agar Sangre porque la catalasa presente en los eritrocitos puede dar resultados falsos positivos.

BACILOS GRAM (-) FERMENTADORES:

Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter:

Identificar las colonias según su color, tamaño y actividad hemolítica.
Estas bacterias se desarrollan en Agar Sangre y Agar Mc Conkey (siendo ésta la mejor diferenciación de las colonias).



Lectura de los cultivos en Agar Mc Conkey:

Las colonias son subcultivadas en medios diferenciales

Se realiza pruebas bioquímicas:

Utilización de la lactosa

Utilización de la glucosa

Producción de gas de glucosa

Descarboxilación de la lisina

Producción de sulfuro de hidrógeno

Utilización de citrato

Producción de ureasa

Producción de indol

Motilidad

Procedimiento:

Identificar la colonia sospechosa que se encuentra en la placa Mc. Conkey

Esterilizar al rojo vivo el asa de siembra recta y dejar enfriar

Obtener la colonia con el asa recta, tratando de no tocar el fondo del medio de cultivo ni otra colonia vecina.

Sembrar por estría en los medios diferenciales empezando por el 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 por estría en la parte inclinada).

Sembrar por puntura en el centro del MIO.

Incubar a 35-37°C de 18 a 24 horas y realizar las lecturas respectivas.

BACILOS GRAM (-) NO FERMENTADORES: Pseudomonas, Acineytobacter, otros.

Observar la morfología de la colonia.

Producción de pigmentos diferentes si están presentes.

Olor característico.

Realizar las pruebas bioquímicas, seguir los pasos descritos para los bacilos gram negativos fermentadores

Prueba de la oxidasa a la Pseudomona.

3. TERCER DIA

Realización de los antibiogramas.

Materiales:

Placas de Müeller Hinton

Estándar de Mc Farland 0.5

Hisopos con punta de algodón

Discos de antibiogramas

Tubos de prueba 13 x 100 estériles

Na Cl 0.85 %

Mechero de Bunsen.

Procedimiento:

Preparación del inóculo:

Con un asa de siembra se tocan 4 o 5 colonias morfológicamente iguales y se suspende en el CINA, hasta que la turbidez sea igual al tubo 0.5 de la Escala de Mc Farland

Siembra de las placas:

Sumergir en el tubo un hisopo estéril, remover el exceso del inóculo rotando el hisopo contra las paredes del tubo.



Con el hisopo, inocular la superficie total del Agar Müeller Hinton, en 3 direcciones para asegurar una distribución uniforme.

Dejar secar entre 3 a 5 minutos.

Colocar los discos de Antibióticos con la ayuda de una pinza estéril, haciendo ligera presión sobre los mismos o asegurando un buen contacto con la superficie del Agar.

Colocar las placas en la incubadora en forma invertida, incubar por 16 – 18 horas a 37 °C.

Realizar la lectura y la interpretación de la prueba.

Medir los halos de inhibición con la ayuda de una regla milimetrada

Interpretar los halos de inhibición como Sensible, Intermedio o Resistente.

GENERALIDADES:

- A.** En el grupo de secreciones se incluyen:
- Muestras del tracto respiratorio alto.
 - Muestras del tracto respiratorio bajo.
 - Muestras de líquidos biológicos: Aquéllas que son obtenidas por punción de cavidades cerradas. Se incluyen al LCR, L peritoneal, pleural, ascítico, pericárdico. Normalmente estas muestras son consideradas estériles y cualquier microorganismo que se aisló debe ser identificado y reportado.
 - Muestras de heridas.
 - Otras secreciones: Sec. ocular, ótica, uretral, prostática, vaginal, endometrial, etc. Son muestras que proceden de los diferentes órganos que están en comunicación con el medio ambiente, unos directamente y otros a través de conductos. Tienen en común la presencia de flora normal y por lo tanto los cultivos de estas secreciones estarán dirigidas a investigar la presencia de gérmenes patógenos.
- B.** Al recibir una muestra debemos asegurarnos de la esterilidad del recipiente, que tenga la cantidad y calidad adecuadas y que sea procesado lo más rápido posible.
- C.** Para la selección de los medios de cultivo se tendrá en cuenta: el origen de la muestra, las especies bacterianas patógenas comúnmente encontradas, flora normal de la región de donde procede la muestra, la información clínica y la coloración de GRAM nos hace sospechar en una infección inusual.
- D.** La forma de siembra recomendada es la de dispersión por agotamiento, obteniendo colonias mejor aisladas.
- E.** Los medios de cultivos que se utilizan para la diversa variedad de muestras se ilustran en el cuadro adjunto.
- F.** Para el estudio microscópico hacer frotis de las porciones más representativas de la muestra (que contengan material purulento y/o sangre). Realizar la coloración GRAM y observar el microscopio.
- G.** Para el reporte de los resultados se considera lo siguiente:
- De muestras estériles: Todos microorganismos deberá ser identificado y reportado con su respectivo antibiograma.
 - De muestras que proceden de zonas que tienen flora normal: o cuando hay incremento no usual de algún componente de la flora normal (desarrollo puro). Si no hay desarrollo de gérmenes patógenos y sólo desarrolla flora normal se reportará:
NO SE AISLA GERMENES PATOGENOS
Si no hay desarrollo: "NO SE AISLA GERMENES"

LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO:

El estudio microbiológico del L.C.R. tiene por finalidad aislar e identificar los agentes microbianos que con mayor frecuencia causan meningitis.



De la Recepción de la Muestra:

- a) Constatar que la solicitud de análisis tenga los datos completos, llenados correctamente con letra legible y con firma del médico solicitante.
- b) Que la solicitud esté debidamente sellado y registrado por caja según tarifa vigente o que tenga el trámite de Servicio Social en caso de exoneración o pendiente de pago.
- c) No tener terapia previa (3 semanas). En casos especiales se realizará el estudio de L.C.R. a pacientes con evolución desfavorable, a pesar de estar recibiendo terapia antimicrobiana.
- d) La muestra debe ser obtenida por el clínico en un frasco de penicilina estéril con tapa de gorra y ser trasladada de inmediato al laboratorio de Microbiología para su procesamiento. En caso de no poder realizar el transporte de inmediato, la muestra se conservará SIEMPRE A 37°C, NUNCA se mantendrá a temperatura ambiente ni se guardará en nevera.
- e) La recepción de la muestra de L.C.R. se realiza en el Servicio de Microbiología hasta las 12 m. y a partir de esa hora son recepcionadas por el Laboratorio de Emergencia, dichas muestras deberán ser conservadas adecuadamente y ser transportadas a Microbiología a las 5 a.m. del día siguiente.
Se debe tener en cuenta que la muestra del L.C.R. se considera prioritaria sobre cualquier tipo de muestra, por lo que se dará entrada para su procesamiento inmediato.

Del Procesamiento:

Antes de iniciar el procesamiento de la muestra, deberá anotar es el aspecto macroscópico del L.C.R.

Si el volumen de la muestra es suficiente (mayor de 2 cc) será centrifugada en tubos estériles con tapón de papel de aluminio durante 10 minutos a 3,000 r.p.m. No debe interrumpirse la centrifugación de una manera brusca, a fin de conseguir una sedimentación total de las células y gérmenes.

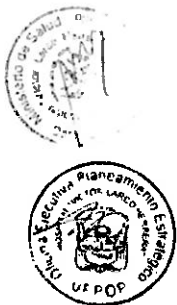
En caso de que el volumen de la muestra no sea suficiente se procederá directamente a la siembra y tinción de la misma.

Luego de centrifugar la muestra (o sin centrifugar) recoger el sedimento con una pipeta Pasteur estéril, conservando el sobrenadante en un tubo de ensayo estéril y sembrar 1 a 2 gotas en los siguientes medios: Thioglicolato, Caldo de infusión cerebro—corazón, Agar sangre, Agar Chocolate con estría de estafilococo. Estos medios deben estar rotulados previamente con:

- ✓ Número de la muestra
- ✓ Fecha de la siembra
- ✓ Atmósfera de incubación

Sembrar en thioglicolato en condiciones anaerobias (no introducir burbujas de aire), para lo cual se introduce la pipeta hasta el fondo del tubo, se libera el L.C.R. al tiempo que subimos la pipeta por la pared del tubo.

Los medios ya inoculados se incubarán a 35°C en las siguientes condiciones:



La placa de Agar Chocolate con estrie de estafilococo en atmósfera de 10% de CO₂. Mientras que las placas de Agar Sangre y el tubo de Thioglicolato se incubarán en aerobiosis. El tiempo de incubación de las placas será de 48 horas. Mientras que el Thioglicolato será incubado hasta 7 días.

5. Visualización de las tinciones:

Se empleará un mínimo de 10 minutos para la observación de cada tinción y se recorrerán un mínimo de 50 campos (X100). Se anotará la cantidad y los diferentes tipos celulares que se observen. Si se observa cualquier tipo de bacteria: Describir su morfología (cocos, bacilos, hongos), su reacción tintorial (gram positivo, gram negativo, gram-variable, BAAR), e informar al clínico el mismo día que ingreso la muestra.

6. Examen de los Cultivos:

Se examinarán los cultivos a las 24 y 48 horas de incubación. Si se observa crecimiento se anotarán los siguientes datos: Medios en que creció, Tiempo de incubación requerido, Atmósfera de incubación, Diagnóstico presuntivo según las características de las colonias y que sueco serán sometidas a una tinción de GRAM. Si no se observa crecimiento a las 48 horas de incubación se descartarán como NEGATIVOS.

7. Identificación:

Neissera meningitidis: Ver aspecto de la colonia, crecimiento en todos los medios sembrados. Ante la sospecha de aislamiento de *Staphilococcus* se realizarán las siguientes pruebas: Oxidasa, Catalasa, Azúcares (glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa). Luego realizar antibiograma en medio de Mueller - Hinton por el método de disco-placa e incubando en atmósfera de CO₂.

Haemophilus influenzae y *Streptococcus*: Ver s. nasofaríngea.

Staphilococcus: Ver aspecto de la colonia, crecimiento en todos los medios sembrados. Ante la sospecha de aislamiento de *Staphilococcus* se realizarán las siguientes pruebas: Catalasa, Coagulasa, Beta-lactamasa, Antibiograma disco-placa e intubación en aerobiosis.

Bacilos gram-negativos: Ver aspecto de la colonia, crecimiento en todos los medios sembrados. Ante la sospecha de aislamiento de bacilos gram—negativos se realizarán las siguientes pruebas: Oxidasa, TSI, Citrato, Urea, Indol, Motilidad, LIA, Antibiograma en medio de Mueller - Hinton por el método de disco-placa e incubación en aerobiosis.

Criptococcus neoformans: Ante la sospecha de *c. neoformans* se realizará: Examen en fresco con tinta china.

Coloración GRAM: Cocos grandes, irregulares y gram-positivos.

Siembra en medio de Saboraud.

Si la muestra de LCR corresponde a un paciente con sospecha y/o con diagnóstico HIV/SIDA se conservará a temperatura ambiente y se coordinará con el responsable de control de calidad para que dicha muestra sea enviada al INS para estudio de aglutinación en látex.

Secreción nasofaríngea:



De la recepción de la Muestra:

La muestra debe ser obtenida por el clínico utilizando un sono de alambre flexible con punta de alginato de calcio. Para esto se inmoviliza al paciente recostando la cabeza hacia atrás, luego se introduce el hisopo, rotándolo dentro de la fosa nasal y pasando hacia la nasofaringe sin forzar, dejar por 5 segundos y retirarlo lentamente.

Para asegurarnos que el hisopo esté en la nasofaringe, éste deberá ser pasado a una distancia que sea la mitad entre la nariz del niño y el extremo de su oreja.

Luego el hisopo se inocular directamente al meato de cultivo o se deposita en el medio de transporte de Amies para su envío al laboratorio. El hisopo no debe mantenerse en el medio de transporte por más de 48 horas y son estables a temperatura de 10°C a 30°C.

Del Procesamiento:

Los hisopados nasofaríngeos tomados del tracto respiratorio superior se usan para inocular en los medios de cultivo primarios. Se deben utilizar también medios selectivos, porque otras bacterias diferentes de *Streptococcus pneumoniae* *Haemophilus influenzae* generalmente están presentes y pueden cubrirlos.

Para *Streptococcus pneumoniae* se usa una placa de Agar Tripticosa Soya con sangre de carnero o caballo (5%); y Sulfato de Gentamicina (5 ug/ml de medio).

Para *Haemophilus influenzae* se use una placa de Agar Chocolate preparada a menos de 80°C con Bacitracina (300 ug/ml de medio).

El hisopo debe rodar sobre un cuarto de la placa luego con un asa bacteriológica se siembra por el Método de Dispersión-agotamiento, para lograr colonia aisladas.

Primero debe inocularse la placa de Agar Sangre con gentamicina, luego la placa de Agar chocolate con bacitracina.

Visualización de la tinción de GRAM:

Streptococcus pneumoniae se presenta como diplococos grampositivos lanceolados, a veces en forma de cadena corta.

Haemophilus influenzae se presenta como bacilos gramnegativos pleomórficos pequeños, raramente agrupados.

Reconocimiento de las colonias:

En el Agar Sangre con gentamicina, *Streptococcus pneumoniae* aparece como una colonia pequeña, grisácea y mucosa, rodeada por una zona verdosa de hemólisis (hemólisis alfa). A las 24 a 48 horas, las colonias se vuelven aplanadas y la parte central se deprime.

En el Agar Chocolate, preparado a menos de 80°C, con bacitracina, *Haemophilus influenzae* aparece como colonias graneles aplanadas, incoloras o gris opacas. No hay hemólisis o decoloración del medio.

H. Identificación del *Streptococcus pneumoniae*:

Prueba del Optochin: La identificación presuntiva del *Streptococcus pneumoniae* se hace determinando la susceptibilidad de la cepa al Optochin.

Con un asa bacteriológica se pica una colonia alfa—hemolítica y se siembra en una en una placa de agar sangre (sangre de carnero al 5%).

Después de la siembra, se coloca asépticamente un disco de Optochin de 6 mm. De diámetro (con 5 ug de Optochin), al final de la siembra inicial.

Las placas se incuban en incubadora con CO₂ o en una jarre con el método de la vela a 35°C por 18-24 horas.



Las cepas alfa—hemolíticas con una zona de inhibición del desarrollo mayor de 16 mm. de diámetro son *Streptococcus pneumoniae*. Las cepas con zonas de inhibición entre 9 y 15 mm. se deberían probar para la solubilidad en bilis.

Solubilidad en Bilis: Esta prueba se utiliza para complementar los resultados obtenidos con la prueba anterior.

Se toma una asada de la cepa desarrollada en la placa de agar sangre, y hacemos una suspensión en 0.5 ml. de solución salina estéril. La suspensión debe ser igual a 0.5 de la escala de McFarland.

La suspensión se divide en dos cantidades iguales (0.25 ml. por tubo), y se agrega 0.25 ml. de solución salina a un tubo y 0.25 ml. de desoxicolato de sodio al 2% (sales biliares) al otro tubo.

Los tubos se examinan periódicamente en busca de lisis de las células en el tubo con sales biliares. La prueba es positiva si existe aclaramiento del tubo; o una disminución en la turbidez.

Streptococcus pneumoniae es soluble en Sales Biliares. La identificación final en base a estas dos pruebas se mencionan en la siguiente tabla.

ESPECIE	PRUEBAS DIFERENCIALES	
	P. Optochin	P. Solubilidad en bilis
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	> 16 mm	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9 – 15 mm	+
No <i>Streptococcus pneumoniae</i>	9 – 15 mm	-
No <i>Streptococcus pneumoniae</i>	< 0 mm	-

9. Identificación de *Haemophilus influenzae*:

El *Haemophilus influenzae* es un organismo fastidioso que requiere medios conteniendo Hemina (Factor X) y Nicotinamida Adenina Dinucleotido (NAD, Factor V). La identificación se basa en el requerimiento con los factores X y V para su desarrollo.

Requerimiento de Factores X y V:



De la placa de aislamiento primario se selecciona una colonia y se subcultiva a una placa de agar chocolate sin bacitracina. Después de la incubación durante la noche, se prepara una suspensión densa en Caldo Trypticasa Soya.

Con un asa grande inoculamos la suspensión en placas de Agar Infusión de Corazón o Agar Trypticasa Soya, se deja sacar, y se colocan tiras de papel o discos conteniendo Factor V, Factor X, y Factor XV. Ver siguiente tabla:

ESPECIES	REQUERIMIENTO DE DESARROLLO		Hemólisis en sangre caballo o conejo al 5%
	Factor X	Factor V	
H. influenza	+	+	-
H. parainfluenza	-	+	-
H. haemolyticus	+	+	+
H. ducreyi	-	+	+
H. aphrophilus	+	-	V
	V	-	-

Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana:

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana miden la capacidad de un antimicrobiano para inhibir el desarrollo bacteriano in vitro. La susceptibilidad antimicrobiana se puede medir fácilmente usando el método de disco-difusión en agar. Describiremos el medio óptimo, el inóculo, los agentes antimicrobianos, las condiciones de incubación y la interpretación de resultados.

Para predecir la resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* se recomienda un disco de oxacilina de 1 ug. Para probar la resistencia al cloranfenicol, se utiliza un disco del mismo de 30 ug., y para probar la resistencia a cotrimoxazol se usa un disco de 25 ug. Para obtener resultados consistentes con el cotrimoxazol debe usarse el Agar de Mueller – Hinton libre de Timidina.

Para predecir la resistencia antimicrobiana de *Haemophilus influenzae* a la penicilina y ampicilina (mediada por beta-lactamasa, así como la resistencia intrínseca) se utiliza discos de Ampicilina de 10 ug. Para probar la resistencia al Cotrimoxazol se usa un disco de 25 ug; y para probar la resistencia al Cloranfenicol, se usa un disco de 30 ug.

- Preparación del inóculo para la Prueba de susceptibilidad:



- El inóculo para la siembra en la prueba de susceptibilidad se prepara de un cultivo puro-fresco de *Streptococcus pneumoniae* (desarrollado en Agar Sangro durante la noche) y *Haemophilus influenzae* (desarrollado en Agar Chocolate durante la noche).
- Se prepara una suspensión celular en solución salina estéril o en caldo. Se utiliza una suspensión celular igual a la densidad 0.5 de la escala de MacFarland.
- La suspensión celular se prepara transfiriendo con un hisopo una porción del crecimiento fresco al medio de suspensión. La densidad se compara, colocando la suspensión y el entandar de Mac Farland frente a una luz contra un fondo blanco que tenga líneas negras.
- Si la suspensión es muy densa, deberá diluirse agregando más medio de suspensión; si es poco densa, deberá agregarse más células a la suspensión.

- **Inoculación del medio para la Prueba de susceptibilidad:**

- Cuando se alcance la densidad apropiada, un nuevo hisopo (de algodón o de dracón) se sumerge en la suspensión, luego se retira y el exceso de líquido se elimina presionando y rotando el hisopo contra la pared del tubo.
- Luego el hisopo se usa para inocular la superficie entera de la placa de Agar Mueller—Hinton suplementado, por tres veces, rotando la placa 60°C entre cada inoculación.
- Se deja secar el inóculo (usualmente unos pocos minutos y no más de 15 minutos) antes de colocar los discos, estos se colocan en el Agar utilizando pinzas estériles y presionándolos suavemente para asegurar la adherencia al agar.
- Las placas con los discos se incuban en posición invertida, a 35-0 por 16 a 16 horas, en una incubadora con 5% de CO₂.
El método de la jarra con vela se puede utilizar si la incubadora con CO₂ no está disponible.

- **Cálculo de la Susceptibilidad de las cepas:**

- Después de la incubación por la noche, se mide el diámetro de cada zona de inhibición con una regla o calibrador. Las zonas de inhibición en el medio conteniendo sangre se miden de la superficie cubierta de la placa con la tapa removida.
- En toda medición, las zonas de inhibición se miden de los bordes del límite visible de desarrollo de colonias. La regla se debe colocar cruzando el centro del disco. Los resultados se registran en milímetros (mm) y la interpretación de la susceptibilidad se obtiene comparando estos resultados con las medidas estándar que se muestran en la siguiente tabla:

AGENTE

DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICION (mm)



	Resistente	Intermedio	Susceptible
Cloramfenicol			
S. pneumoniae	< 25	26 – 28	> 29
H. influenzae	< 12	13 – 17	> 18
Cotrimoxazol			
S. pneumoniae	< 18	11 – 15	> 16
H. influenzae			
Oxacilina			
S. pneumoniae	< 19	-	> 20
Ampicilina			
H. influenzae	< 19	-	> 20

Preservación y Transporte de S. pneumoniae y H. influenzae:

Para confirmar la identificación y susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas puede ser necesario preservar y transportar las cepas a Laboratorios de Referencia, S. pneumoniae y H. influenzae son bacterias frágiles, y se debe tener mucho cuidado para su preservación y transporte.

La viabilidad durante un corto tiempo de almacenaje (más o menos una semana) es mejor si ambos; S. pneumoniae y H. influenzae son inoculados en Agar Chocolate inclinado (en tubos con tapa rosca), incubados por la noche a 35°C y luego mantenidas a 4°C. El almacenaje por largos periodos se realiza mejor por liofilizado o congelación.

Los cultivos con embalaje apropiado se pueden transportar sin refrigeración. Los viales o tubos conteniendo los cultivos se colocan en un envase metálico el cual se incluye en un envase de envío. Se pegan al envase de envío una etiqueta con a la dirección y otra con advertencia del agente etiológico. El cultivo se incluye dentro del envase metálico con suficiente material absorbente para absorber todo el cultivo en caso que el tubo o vial se rompa. No se debe enviar más de 50 ml de cultivo en paquete.

SECRECIÓN PROSTATICA:

De la Recepción de la Muestra:

1. La muestra debe ser obtenida por el Urólogo, luego de masaje prostático, utilizando una pipeta Pasteur estéril y tratando de obtener un volumen mínimo de 12.5 ul, la que será disuelta en 2000 ul de suero fisiológico estéril.
2. De inmediato debe ser enviado al laboratorio de Microbiología para su procesamiento, adjuntado la solicitud con datos llenados correctamente y con el correspondiente registro de caja o el trámite de exoneración o pendiente de pago por Servicio Social.

Las muestras son recepcionadas hasta las 12 m.



Codificar con clave "S" y "N" correspondiente y registrar en el cuaderno respectivo el día en que se recibe la muestra.

Del Procesamiento

Recuento de colonias:

1. Licuar el Agar Mueller Hinton preparados en tubos de prueba estériles en una cantidad de 18 ml, dejarlo enfriar hasta una temperatura aproximada de 45° C.
2. Frente a un mechero y en forma aséptica inocular 1000 ul de la muestra diluida en una placa petri estéril, utilizando una pipeta de vidrio estéril del cc de capacidad.
3. Rápidamente añadir el agar licuado y enfriado a 45°C a la placa petri que contiene la muestra y realizar movimientos de rotación suaves para homogenizar la muestra.
4. Dejar enfriar hasta que solidifique el agar
5. Cubrir con envoltura las placas petri e incubar a 37°C por 24 a 72 horas.

RESULTADO:

El número de colonias debe multiplicarse por el factor de dilución: x 160 (2000/12.5).

Cultivo:

La selección de los medios de cultivo apropiados depende de los resultados de la tinción GRAM, del examen directo y del diagnóstico clínico provisional.
Se recomienda utilizar medios primarios y selectivos a fin de cubrir hasta donde sea posible la mayor cantidad de agentes etiológicos que se esperan encontrar en las infecciones del tracto genital.

Microorganismos de importancia clínica:

Control de calidad interno de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos por disco difusión.

(Método de Kirby – Bauer).

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha



--	--	--	--

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE Y MODIFICACIONES
01		Edición Inicial

COPIA REGISTRADA Nº. ASIGNADA
 A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital Nacional Víctor Larco Herrera. La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del responsable de su elaboración.

Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Control de calidad interno para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos por el método de difusión con discos.

1. Objetivo

Los objetivos de un programa de control de calidad para el método de difusión con discos son: monitorizar la precisión y exactitud del procedimiento, el funcionamiento de los reactivos (medios y discos), y el modo de proceder del personal que realiza la prueba, la lectura, la interpretación e informe de los resultados. Para alcanzar estos objetivos se utilizan cepas control que se seleccionan en base a su estabilidad genética y su utilidad para validar esta prueba. Por ello es necesario contar con un documento normativo que describa los procedimientos que se deben de seguir para el control de calidad de la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de disco difusión (Kirby – Bauer) en el Hospital Nacional Víctor Larco Herrera.

2. Fundamento

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



relación con el grado de sensibilidad o resistencia del microorganismo a la acción del antimicrobiano.

El medio de cultivo donde se realice la prueba de sensibilidad debe ser estándar (generalmente Agar Mueller-Hinton) y el inóculo debe estar asimismo estandarizado.

3. Cepas de referencia

Las cepas de referencia recomendadas por el CLSI para controlar la precisión y exactitud del procedimiento de difusión con discos para la determinación de la sensibilidad de bacterias no fastidiosas son:

Enterococcus faecalis	ATCC 29212,
Staphylococcus aureus	ATCC 25923,
Escherichia coli	ATCC 25922,
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853 y
Escherichia coli	ATCC 35218.

La cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se utiliza para control de la potencia de los discos de antimicrobianos para gram positivos y gram negativos.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, se usa para verificar las concentraciones de cationes en el medio Mueller Hinton, además de controlar la potencia de los discos de antimicrobianos utilizados para *Pseudomonas*.

La cepa *Escherichia coli* ATCC 35218, solamente se utiliza como control de las combinaciones de beta-lactámico con inhibidor de beta-lactamasas, como ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam.

La cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 se utiliza para monitorizar los niveles de inhibidores de trimetoprim o sulfamidas en agar Mueller-Hinton, así como para controlar los discos que contienen altas concentraciones de gentamicina o estreptomina.

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

4. Periodicidad

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



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

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

5. Medios de cultivo, Reactivos y Productos

- Discos de antimicrobianos (puede ser de diferentes casas comerciales).
- Tubos con agua, Solución salina o caldo de cultivo estéril.
- Placas de agar Mueller-Hinton.
- Placas de agar Mueller-Hinton con 5% sangre de carnero.
- Placas de agar HTM (Haemophilus Test Medium).
- Escala de Mac Farland 0.5 (tubos con diferentes concentraciones de sulfato de bario).

Localización: los discos de antimicrobianos se deben guardar en congelación y las placas con los medios de cultivo en refrigeración. La escala de MacFarland debe guardarse a temperatura ambiente y protegida de la luz en oscuridad.

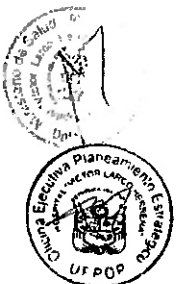
6. Procedimiento

Los cultivos de cepas ATCC que se vayan a utilizar deben ser recientes (18-24 h) y estar en medio de agar sangre o en Mueller Hinton. Los antimicrobianos a ensayar frente a cada microorganismo están indicados según la normativa (Anexo 1), aunque puede haber variaciones en cuanto a antimicrobianos a ensayar según el tipo de cepa ATCC. Siempre que se utilice un nuevo antimicrobiano debe ensayarse con las cepas de referencia.

Aparatos y material necesario:

- Torundas de algodón estériles.
- Dispensadores multidiscos o pinzas.
- Estándar de turbidez 0.5 de la Escala de Mc Farland.

A. Rotular un tubo de agua destilada o NaCl 0.85% por cada cepa ATCC.



- B. Inocular y resuspender homogéneamente cada tubo de agua destilada con varias colonias del microorganismo problema hasta conseguir una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland. Agitar manualmente o con un agitador Vortex (alternativamente se pueden utilizar para el inóculo microorganismos crecidos en un caldo de cultivo que posteriormente se debe ajustar al 0,5 de la escala de Mc Farland).
- C. Antes de 15 minutos de preparado el inóculo, impregnar la torunda de algodón con la suspensión bacteriana, escurrirla contra la pared del tubo haciendo hasta 10 giros y sembrar con ella toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton mediante estrías cruzadas en varias direcciones rotándola 3 veces.
- D. Utilizando unas pinzas previamente flameadas y frías colocar los discos de los diferentes antimicrobianos sobre la placa antes de 15 minutos desde que se inoculó la placa con la suspensión bacteriana.
- E. Incubar en estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (antes de 15 minutos desde que se aplicaron los discos), durante 18-24 horas. En el caso de Staphylococcus y Streptococcus la incubación debe ser de 24 horas completas.
- F. Una vez realizada la determinación, las cepas ATCC se guardarán medios de conservación apropiados en nevera a $4^\circ - 8^\circ\text{C}$.
- G. Obtención de resultados y criterios de aceptación y rechazo
- Medir con una regla los halos de inhibición y anotar los resultados (en milímetros) en una hoja de registro correspondiente. (Anexo 2)
 - Rangos aceptables: los resultados de los halos de inhibición para cada combinación de antimicrobiano/cepa ATCC se indican en el documento vigente del CLSI, que en el momento actual es el M100-S20. enero 2010.
 - Criterios de aceptación y rechazo: no se aceptará ningún lote de medios o discos si los halos de inhibición de las cepas ATCC no están dentro de los márgenes establecidos por el documento vigente correspondiente del CLSI.
- H. Responsabilidades:
El personal de la sección de control de calidad será el responsable de la realización de la técnica y de su lectura, así como de la aceptación o rechazo de los lotes de antimicrobianos que deberá anotarlos en un libro de registro del servicio de microbiología e informar a todo el personal implicado en la realización de esta técnica. La realización diaria de las pruebas de sensibilidad por el método de difusión con discos con las cepas ATCC corresponde al personal del laboratorio que realicen rutinariamente las pruebas de sensibilidad.
- I. Anotaciones al procedimiento
Algunos microorganismos no crecen en agar Mueller-Hinton y por tanto no se puede realizar la determinación de sensibilidad a antimicrobianos en este medio. En el caso de las especies del género Streptococcus se puede suplementar este medio con 5% de sangre desfibrinada de oveja o caballo, para Haemophilus se utilizará el medio HTM (Haemophilus Test Medium) y para Neisseria gonorrhoeae se utilizará agar chocolate-Mueller-Hinton. Las cepas control que se deben utilizar para controlar los correspondientes medios y discos son: Streptococcus pneumoniae ATCC 49619, Haemophilus influenzae ATCC 49247 y Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226, respectivamente. Asimismo, los rangos aceptables para cada combinación antimicrobiano/cepa ATCC se indican en el documento vigente del CLSI, actualmente el M100-S20. enero 2010.
- J. Limitaciones del procedimiento
El método permite la determinación de sensibilidad a antimicrobianos de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, pero no está estandarizado para la



determinación de sensibilidad a antimicrobianos de microorganismos anaerobios estrictos.

VII. RESPONSABILIDADES

El jefe de la Unidad y el personal es responsable de cumplir y actualizar el presente Manual Técnico de Procedimientos.

El jefe del departamento es responsable de visar los procedimientos de su competencia antes de su aprobación; asimismo su implementación y cumplimiento en coordinación con la Oficina de Planeamiento Estratégico.

VIII. ANEXOS:

Anexo 1 Antimicrobianos recomendados por la CLSI para determinación e informe de sensibilidad.

Anexo 2 Hoja de Registro de Control de Calidad de Antimicrobianos por disco Difusión

Anexo 3 Esputo y jugo gástrico para tuberculosis.

Anexo 4 El laboratorio en el control de la tuberculosis

Anexo 5 Informes que se realizan: mensual – trimestral.

Anexo 6 cultivo y examen directo de hongos

IX. BIBLIOGRAFIA

- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds). 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. N° 10. Procedimientos en Microbiología Clínica 2000. Coordinador: E. Loza; Editor: J.J. Picazo.
- CLSI. 2010. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement Approved Standard M100-S20. CLSI. Wayne, Pennsylvania.
- Instituto Nacional de Salud. MANUAL DE NORMAS DE BIOSEGURIDAD. Serie de Normas Técnicas N° 18. 2007.
- Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2008.
- Recomendaciones del Grupo de Estudio de los mecanismos de acción y resistencia a los Antimicrobianos (GEMARA). 2006.
- Normas para realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos con discos.
- Norma aprobada, décima edición. M02-A10 Vol. 29 No. 1. enero 2009.



ANEXO 1

Antimicrobianos recomendados por la CLSI para determinación e informe de sensibilidad.

Staphylococcus aureus y coagulasa negativa:

- 1° Panel: oxacilina, penicilina, eritromicina (o claritromicina o azitromicina), clindamicina, cotrimoxazol, gentamicina, ciprofloxacino, cloranfenicol o nitrofurantoina.
2° Panel: doxiciclina, rifampicina, teicoplanina, cefoxitin, vancomicina, tetraciclina, novobiocina, fosfomicina 50ug, polimixina B, kanamicina, amikacina, linezolid y otros.

Enterococcus:

- 1° Panel: ampicilina, penicilina, eritromicina, ciprofloxacino, cloranfenicol o nitrofurantoina, gentamicina 120ug y estreptomina 300ug (screening de resistencia de alto nivel en aislados de sangre y LCR).
2° Panel: doxiciclina, rifampicina, teicoplanina, vancomicina, tetraciclina, fosfomicina 200ug, linezolid, quinupristina-dalfopristina y otros.

Enterobacteriaceae:

- 1° Panel: Ampicilina, amoxicilina /ácido clavulánico, cefalotina o cefazolina, cefotaxima, cefixima, cefuroxima, ceftazidima, gentamicina, norfloxacino o ciprofloxacino o levofloxacino, cotrimoxazol, nitrofurantoina o cloranfenicol.
2° Panel: doxiciclina, tetraciclina, piperacilina/tazobactam, piperacilina o ticarcilina, cefepima, cefoperazona/sulbactam, cefoxitina, ampicilina, ertapenem, imipenem o meropenem.
3° Panel salmonella - shigella: Ampicilina, amoxicilina /ácido clavulánico, ceftriaxona, ciprofloxacino, ácido nalidixico, cotrimoxazol, nitrofurantoina y cloranfenicol.

Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter spp.

- 1° Panel: Ceftazidima, cefepime, aztreonam, meropenem, ciprofloxacino, cefoperazona / sulbactam.
2° Panel: piperacilina/tazobactam, ticarcilina o piperacilina, gentamicina, tobramicina, ampicilina, imipenem, ertapenem, colistin o polimixina B.
3° Panel complementario para Acinetobacter spp: cotrimoxazol, ampicilina/sulbactam, Levofloxacino, doxiciclina, tetraciclina.

Streptococcus (excluyendo neumococo):

- Penicilina o ampicilina, cefotaxima o ceftriaxona, eritromicina, clindamicina, vancomicina, levofloxacino, bacitracina 0.04ug, cotrimoxazol, optochin.

Streptococcus pneumoniae:

- Oxacilina, eritromicina, cotrimoxazol, clindamicina, levofloxacino, cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina, vancomicina, rifampicina, optochin.

Haemophilus spp.

- Ampicilina, cotrimoxazol, cefotaxima, cefuroxima, meropenem.



Nota: Se puede establecer una normativa en función de la política de antibióticos del hospital y de las indicaciones del comité de infecciones intrahospitalarias.

ANEXO 2

Hoja de Registro de Control de Calidad de Antimicrobianos por disco Difusión



Documento Técnico: Manual Técnico de Procedimientos en Microbiología

Hospital Nacional Hipólito Unanue
Servicio de Microbiología

Responsable :

Fecha : / /2010

Registro de Control de Calidad de Antimicrobianos - Prueba Disco Difusión

Agente Antimicrobiano	Lote	Marca	Fecha Venc	E. coli ATCC 25922		S. aureus ATCC 25923		P. aeruginosa ATCC 28573		E. coli ATCC 35218		E. faecalis ATCC 29212		RESULTADO	ACCIÓN CORRECTIVA
				mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm				
Acido Nalidixico			/	22-28		-		-		-		-			
Amikacina			/	19-26		20-26		18-26		-		-			
Amoxicil/ Ac. clav			/	18-24		28-36		-		17-22		-			
Ampicilina			/	16-22		27-35		-		6		-			
Ampicilina/Sulbac			/	19-24		29-37		-		13-19		-			
Aztreonam			/	28-36		-		23-29		-		-			
Cefalotina			/	15-21		29-37		-		-		-			
Cefepime			/	31-37		23-29		24-30		-		-			
Cefixime			/	23-27		-		-		-		-			
Cefotaxima			/	29-35		25-31		18-22		-		-			
Cefoxitina			/	23-29		23-29		-		-		-			
Cefuroxima			/	20-26		27-35		-		-		-			
Ceftazidime			/	25-32		16-20		22-29		-		-			
Ceftriaxona			/	29-35		22-28		17-23		-		-			
Ciprofloxacina			/	30-40		22-30		25-33		-		-			
Clindamicina			/	-		24-30		-		-		-			
Cloranfenicol			/	21-27		19-26		-		-		-			
Colistina			/	11-17		-		11-17		-		-			
Doxiciclina			/	18-24		23-29		-		-		-			
Eritromicina			/	-		22-30		-		-		-			
Estreptomina (10ug)			/	12-20		14-22		-		-		-			
Gentamicina (10ug)			/	19-26		19-27		16-21		-		-			
Imipenem			/	26-32		-		20-28		-		-			
Kanamicina			/	17-25		19-26		-		-		-			
Levofloxacina			/	29-37		25-30		19-26		-		-			
Meropenem			/	28-34		29-37		27-33		-		-			
Minociclina			/	19-25		25-30		-		-		-			
Nitrofurantoina			/	20-25		18-22		-		-		-			
Norfloxacina			/	28-35		17-28		22-29		-		-			
Ofloxacina			/	29-33		24-28		17-21		-		-			
Oxacilina			/	-		18-24		-		-		-			
Penicilina			/	-		26-37		-		-		-			
Piperacilina			/	24-30		-		25-33		12-18		-			
Piperacilina/Tazobact			/	24-30		27-36		25-33		24-30		-			
Polimixina B (300 U)			/	13-19		-		14-18		-		-			
Rifampicina			/	8 - 10		26-34		-		-		-			
Sulperazona			/	28-34		24-33		23-29		-		-			
Teicoplanina			/	-		15-21		-		-		-			
Tetraciclina			/	18-25		24-30		-		-		-			
Tobramicina			/	18-26		19-29		19-25		-		-			
Trimet/sulfametox			/	23-29		24-32		-		-		≥ 20			
Vancomicina			/	-		17-21		-		-		-			
Gentamicina (120ug)			/	-		-		-		-		16-23			
Estreptomina (300ug)			/	-		-		-		-		14-20			
Fosfomicina (200ug)			/	22-30		25-33		-		-		-			
Ceftazidime Ac Clav			/							≤ 2					
Cefotaxima Ac Clav			/							≤ 2					

Observaciones :



ANEXO 3

ESPUTO Y JUGO GASTRICO PARA TUBERCULOSIS

De la Recepción de la Muestra:

1. Constatar que la solicitud de análisis tenga los datos completos, llenados correctamente con letra legible y con firma del médico solicitante.
2. Que la solicitud esté debidamente sellado y registrado por caja según tarifa vigente o que tenga el trámite de Servicio Social en caso de exoneración o pendiente de pago.
3. La muestra de esputo es una mezcla de secreciones del tracto respiratorio inferior y superior. Es necesario tener en cuenta que en este tipo de muestra existe una gran facilidad de contaminación con la flora orofaríngea. Esto puede evitarse si se recomienda al paciente que se lave la boca con solución salina o agua tibia antes de obtener la muestra; nunca se deben usar antisépticos.
Si hay dificultad para una buena expectoración, puede facilitarse pidiendo al enfermo que colabore, que tosa y golpeándole suavemente el tórax en la zona donde se sospeche que hay patología pulmonar. O colocando al paciente en la postura que más facilite el drenaje. O bien administrándole nebulizaciones de una solución hipertónica de ClNa (5-10% > calentada, esta solución tiene como fin humedecer el aire que va al tracto respiratorio inferior facilitando la capacidad de los cilios para ascender las secreciones deshidratadas, viscosas y gruesas.
4. Se recomienda recoger el primer esputo de la mañana en envase estéril con tapa rosca. La muestra debe ser conservada en refrigeración a 4°C.

Del Procesamiento:

1. Examen macroscópico. - Consiste en anotar las características del esputo pudiendo ser: saliva, purulento, mucopurulento, hemoptoico, adherente, etc.
2. Examen microscópico:
 - a) Tinción de Ziehl-Neelsen: Para investigación de BAAR. Se toma muestra de la porción más representativa (la porción purulenta).
 - b) Tinción de Gram: Tiene como fin hacer un estudio citológico del esputo mediante la relación N° de leucocitos/N° de células epiteliales (CE) por campo, pudiendo valorar con esto el tipo de muestra con el siguiente criterio de interpretación:
 - ✓ Si se observan 10 CE por campo y ningún polimorfonuclear, la muestra no es adecuada por indicar contaminación orofaríngea, por lo tanto, no será cultivada.
 - ✓ Si se observan 10 CE por campo y 25 polimorfonucleares, la muestra es aceptable.
 - ✓ Si se observan 10 o ninguna CE por campo y 25 polimorfonucleares, la muestra también se considera aceptable.

Los microorganismos que se valoran en una muestra de esputo son:

- Mycobacterium tuberculosis y otros Mycobacterium
- Streptococcus beta-hemolítico del grupo A
- Streptococcus pneumoniae
- Staphylococcus coagulasa positivo
- Haemophilus influenzae



Enterobacterias, Pseudomona aeruginosa, Candida albicans que serán valorados si se encuentran en cultivo puro.

Entre otros tipos de muestra procedentes del tracto respiratorio bajo, además del esputo, están considerados:

Aspirado bronquial y lavado bronquial. - Esta muestra se obtiene mediante fibrobroncoscopía, y tiene menor probabilidad de contaminación.

La fibrobroncoscopia con aspirado bronquial está indicado en:

- Lesiones pulmonares difusas en inmunodeprimidos no diagnosticados por punción transtraqueal.
- Sospecha de infección por mycobacterias sin que el esputo confirme el diagnóstico.
- Inmunodeprimidos con sospecha de Nocardiosis, Micosis oportunistas o neumonía por Pneumocistis carinii.

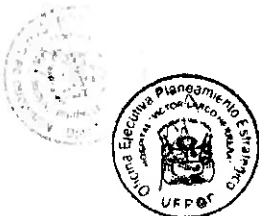
La interpretación de una Aspirado bronquial se va a realizar de la misma manera que para el esputo.

Punción transtraqueal. - Es una de las mejores técnicas para recoger las secreciones bronquiales, por no existir posibilidad de contaminación orofaríngea. Es el único sistema válido para el diagnóstico etiológico de las infecciones pleuropulmonares por bacterias anaerobias, siempre y cuando el envío y el transporte de la muestra se realicen en forma adecuada.

Debido a que teóricamente se elimina la contaminación orofaríngea se debe valorar cualquier microorganismo que se encuentre.

Aspirado transpulmonar. - Es una muestra de gran importancia, ya que carece de posibles contaminaciones por las secreciones de las vías respiratorias superiores y del árbol traqueobronquial. La punción transpulmonar está particularmente indicada en el diagnóstico de lesiones focales periféricas de cavitación.

Se debe valorar cualquier microorganismo que se encuentre.



ANEXO 4

EL LABORATORIO EN EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

La "Solicitud de Investigación Bacteriológica en TB" deberá ser correctamente llenada.
La recepción de muestras se realizará durante todo el horario de atención del establecimiento de salud y no se deberá rechazar las muestras de saliva.

Bacteriología de la tuberculosis

La bacteriología en tuberculosis comprende la realización de baciloscopias, cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*, pruebas de sensibilidad y de tipificación.

En los laboratorios se recibirá y procesará toda muestra, sin excepción, conservando las medidas de bioseguridad.

Baciloscopia

Es la herramienta fundamental rutinaria para el diagnóstico de la tuberculosis y el seguimiento del tratamiento de los pacientes con tuberculosis pulmonar.

Deberá emplearse en toda muestra pulmonar o extrapulmonar y para el control mensual del tratamiento y retratamiento antituberculoso, y previamente en toda muestra que se decida derivar a cultivo.

LA BACILOSCOPIA o EXAMEN MICROSCOPICO DIRECTO

El examen microscópico directo o baciloscopia es la técnica fundamental en la investigación bacteriológica de la tuberculosis, tanto para el diagnóstico como para el control del tratamiento. Todas las muestras para baciloscopia tienen que ser:

- a) Extendidas y fijadas
- b) Coloreadas
- c) Observadas al microscopio

Para la realización de la baciloscopia contamos con sectores de:

Recepción de muestras.

Preparación de muestras (mesa de trabajo)

Extendido y fijación de la muestra (cabina de bioseguridad)

Coloración de los extendidos. (Lavadero)

Microscopía y registro de resultados.

El personal que realiza el trabajo debe de tener presente lo siguiente

Antes de empezar el trabajo, el personal encargado debe lavarse las manos y ponerse un guardapolvo de protección lo más largo posible, gorro, mascarilla y guantes.

Luego cerciorarse que no le falte ningún reactivo ni material.

Materiales de trabajo que se requiere para la realización de la baciloscopia son:

Cabina de bioseguridad.

Microscopio binocular, con objetivo de inmersión.



Láminas portaobjetos.
Baja lenguas de madera.
Mechero o hisopo de algodón.
Lápiz para marcar vidrio
Soporte de madera para láminas
Recipiente para colocar los palitos de madera
Recipiente de metal con tapa para colocar la muestra trabajada.
Reactivos: fucsina básica, azul de metileno, alcohol ácido, fenol al 5%, alcohol al 70 %
Aceite de inmersión.
Papel lente.
Papel de filtro.
Libro de Registro.

a) EXTENDIDO Y FIJACIÓN DE LA MUESTRA

Al hacer el extendido cuidar que las láminas sean nuevas.

Colocar en el interior de la cabina de bioseguridad una bandeja de acero inoxidable (dimensiones recomendadas: 60 x 40 x 10 cm) con papel humedecido con fenol al 5%. para descartar las muestras y otra bandeja con fenol al 5% para descartar los palitos, envases conteniendo las muestras de esputo previamente rotulados, láminas portaobjetos sobre el soporte de madera, también colocar las baja lenguas de madera

Una vez que se tiene todo listo para trabajar las muestras se realiza lo siguiente:

Deberá trazarse una línea en cada lámina portaobjeto empleando el lápiz graso, la que dividirá la superficie en una tercera parte destinada a la numeración y dos terceras partes para hacer el extendido. Esta línea debe trazarse en la cara inferior de la lámina a fin de evitar que se borre la numeración

Destapar cuidadosamente el envase de la muestra que se va a procesar, manteniendo la boca del envase cerca del mechero encendido.

- Dividir un aplicador de madera (baja lengua) en dos o tres partes y tomarlo entre el pulgar y el índice de la mano
- seleccionar y extraer la partícula útil, que es la porción muco-purulenta de color amarillo verdoso del esputo, enrollándola en el aplicador.
- Colocar la partícula útil sobre el portaobjeto y extenderla, haciendo movimientos de vaivén, hasta lograr que el extendido sea homogéneo (ni muy fino ni muy grueso), que no llegue a los bordes de la lámina, para evitar que el operador se contamine al manipularla.
- **Por ningún** motivo debe calentarse la lámina mientras se haga el extendido, debido a que por el calor se forman círculos concéntricos y precipitados granulosos.
- Colocar sobre el soporte de madera y dejar secar a temperatura ambiente.
- Terminado el extendido. descartar los aplicadores en la bandeja con fenol al 5%
- Cerrar el envase y proseguir en igual forma para las demás muestras.
- Fijar cada lámina, una vez seca, mediante dos o tres pasajes rápidos sobre la llama del mechero con el extendido hacia arriba.

b) COLORACION DEL EXTENDIDO (TECNICA DE ZIEHL NEELSEN)

La técnica más recomendada es la tinción de Ziehl Neelsen. Antes de su uso, todos los colorantes y soluciones a emplearse deben ser previamente filtrados. Esta técnica tiene 3 pasos que son las siguientes:

Primer paso: coloración de bacilos



- Colocar sobre el lavadero el soporte de coloración (soporte de madera o varilla de vidrio) con la serie de láminas fijadas con el extendido hacia arriba.
- Colocar el número hacia el operador de tal forma que la varilla próxima al operador quede ligeramente más alta que la otra.
- Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con la colorante fucsina básica fenicada, filtrada en el momento de efectuar la tinción. No use colorante sin filtrar.
- Calentar suavemente con la llama del mechero o un hisopo de algodón humedecido en alcohol hasta la emisión de vapores, repetir el proceso por tres veces, no debe hervir la preparación. Si el volumen del colorante disminuye por evaporación, debe agregarse más hasta cubrir totalmente el extendido y dejar enfriar.
- El tiempo mínimo de coloración con fucsina es de 5 minutos.
- Eliminar la fucsina inclinándola hacia delante el soporte de madera y dejar caer agua corriente a baja presión sobre la parte que no tiene el extendido.

Segundo paso: decoloración

- Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con alcohol ácido durante 30 segundos a un minuto, hasta obtener una coloración rosa pálido. De ser necesario decolorar nuevamente, efectuando movimientos en vaivén de la lámina.
- Una vez eliminado el alcohol ácido lavar nuevamente la lámina con agua a baja presión, cuidando de no desprender la película que formó el extendido.

Tercer paso: coloración de fondo o contraste

- Cubrir la superficie del extendido con el colorante azul de metileno previamente filtrado durante 30 segundos a un minuto.
- Eliminar el azul de metileno y lavar con agua a baja presión, por ambos lados (el que tiene el extendido, como el otro lado).
- Limpiar con algodón el reverso de la lámina la parte que no tiene el extendido y colocar las láminas coloreadas en orden numérico sobre el soporte de madera y dejar secar al medio ambiente.
- Verificar la numeración y se numerarán de nuevo si es necesario, antes de llevarlos a la mesa para su observación microscópica.

Eliminación de los materiales contaminados

Los materiales contaminados (envases de esputo, aplicadores, papeles del área de trabajo) que se colocaron en el recipiente metálico se llevan a esterilizar en autoclave.
Limpiar bien toda la superficie de la mesa donde se ha preparado las muestras (enumerado) con una solución desinfectante, y la cabina de bioseguridad con alcohol al 70%.

OBSERVACION MICROSCOPICA DE LA MUESTRA COLOREADA

Los bacilos aparecerán como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, teñidos de rojo, aislados, en parejas o en grupos sobre un fondo azul claro.
Es aconsejable seguir una pauta uniforme de observación, avanzando de izquierda a derecha del extendido, y observando un mínimo de 100 campos útiles, lo que un laboratorista capacitado hace en aproximadamente 5 minutos.



Se considera campo microscópico útil aquel en el cual se observa elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células ciliadas). Los campos en que no aparezcan dichos elementos no deben contabilizarse en la lectura.

Para la observación se debe emplear un microscopio que esté en buenas condiciones y cuente con el objetivo de inmersión IOOX, antes de usar el objetivo de 100x, se debe colocar una gota de aceite de inmersión sobre el extendido.

Cada campo microscópico, se debe observar en superficie y en profundidad, para lo cual se utilizará permanentemente el tomillo micrométrico.

La observación microscópica, tiene dos objetivos importantes:

- a) Determinar si en el extendido hay Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR).
- b) Establecer su número aproximado.

El observador irá tomando nota del número de bacilos observados y del número de campos microscópicos a observarse, que variará según la cantidad de bacilos que contenga la muestra. Al término de la lectura retirar la lámina de la platina del microscopio, limpiar el aceite de inmersión de la lámina y guardar la lámina.

EL aceite del objetivo de inmersión del microscopio se quita con papel para lentes o algodón ligeramente humedecido con xilol. La superficie exterior de los oculares debe limpiarse diariamente. Recordar que tanto los párpados como las pestañas tienen grasa, y al apoyarlos sobre los oculares, las lentes pueden ensuciarse. Para la limpieza debe emplearse papel lente.

Informe de resultados

Se recomienda la siguiente escala semicuantitativa:

Negativo	(-): No se encuentran BAAR en 100 campos microscópicos observados.
Positivo	(+): Menos de un BAAR por campo en 100 campos observados (de 10-99 BAAR).
Positivo	(++): Uno a 10 BAAR por campo, en 50 campos observados.
Positivo	(+++): Más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados.

Si en una lámina se encuentra sólo de 1 a 9 bacilos en 100 campos microscópicos observados, debe ampliarse la lectura a otros 100 campos más. Si persistiese el resultado, realizar otro extendido de la misma muestra e informar lo encontrado y solicitar nueva muestra, Es conveniente hacer el cultivo de aquellas muestras en las que se encontraron de uno a nueve BAAR.

Cultivo de muestras para investigación de Mycobacterium tuberculosis

El cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico de los que se conocen en la actualidad para detectar la presencia de micobacterias, en particular del Mycobacterium tuberculosis, en una muestra determinada.

Entre los métodos bacteriológicos más usados para el diagnóstico de la tuberculosis se encuentran la baciloscopia y el cultivo de Micobacterias.

El hospital realiza el cultivo en medio OGAWA.

Indicaciones para cultivo de Mycobacterium tuberculosis:



PARA DIAGNOSTICO:

- La segunda muestra del S.R. con radiografía de pulmones sospechosa de TB (Rx Anormal) en seguimiento diagnóstico.
- Muestra paucibacilar de baciloscopia; es decir, cuando se encuentra de 1 a 9 BAAR en 100 campos microscópicos observados.
- Muestras extrapulmonares: todas las muestras de biopsias, piezas anatómicas, tejidos y fluidos (exudados, orina, LCR, líquido sinovial, etc.) de casos con sospecha de TB extrapulmonar, deberán ser sometidos a estudios bacteriológicos mediante baciloscopia directa y cultivo de M. t.
- Toda muestra pulmonar o extrapulmonar de los pacientes portadores del VIH (VIH positivos) y sospecha de tuberculosis.
- Muestra de baciloscopías negativas en menores de 15 años para diagnóstico de TBP.
 - Se cultiva todas las muestras para estudios epidemiológico de resistencia primera y secundaria de M. tuberculosis

PARA CONTROL:

- Muestra de pacientes con sospecha de fracaso al esquema primario (uno) de tratamiento, por persistencia de baciloscopia directa positiva al quinto mes de tratamiento o cuando presenta baciloscopías positivas en dos controles sucesivos después de un período de negativización de dos meses.
- Muestra de pacientes con sospecha de fracaso al esquema secundario (dos) de tratamiento, por persistencia de baciloscopia directa positiva al cuarto mes de tratamiento o cuando presenta baciloscopías positivas en dos controles sucesivos después de un período de negativización de dos meses.
- Muestra de pacientes con TB-MDR en retratamiento para el control del tratamiento.
- Muestras de pacientes crónicos multitratados (más de dos tratamientos completos previos) y con persistencia de positividad a la baciloscopia directa.
- En forma excepcional, el laboratorista derivará a cultivo muestras a pedido y bajo responsabilidad de los médicos, quienes deberán indicar en observaciones de la "Solicitud de Investigación Bacteriológica en Tuberculosis" las condiciones del paciente que ameriten la prueba, que sean diferentes a las antes mencionadas.

PROCEDIMIENTO DE CULTIVO: METODO Ogawa - Kudoh

Materiales y equipos para realizar el cultivo

Cabina de seguridad biológica
Gradilla
Tubos con medio OGAWA
Tubos de 25x150
Pipeta de 10 ml
Pipeta Pasteur
Hidróxido de Sodio NaOH al 4 % estéril
Estufa a 37 C
Baño maría a 37C
Agitador mecánico
Muestra



Solución acuosa de fenol 5%

Pro pipeta

Bandeja de Acero inoxidable

Descontaminación

La descontaminación tiene por finalidad:

Eliminar la flora asociada, que se encuentra en la mayoría de las muestras, ya que esta flora se multiplica más rápidamente que el bacilo y pueden afectar al medio de cultivo

Homogenizar la muestra, especialmente el esputo a fin de liberar el bacilo del mucus, material y tejidos en los que está incluido.

En algunos casos la siembra puede ser directa y se puede prescindir de la descontaminación, siempre que la muestra haya sido tomada asépticamente y recolectada en un recipiente estéril y sea escasa como por ejemplo muestras tomadas por punción como medula ósea líquida cefalorraquídea, líquido pleural, peritoneal, líquido sinovial, secreción de ganglio y articulares pero si existe una buena cantidad de muestra se someterá al procedimiento de descontaminación antes de cultivarla.

La descontaminación de las muestras se realiza con hidróxido de sodio NaOH al 4%, solución acuosa estéril

Las muestras que tienen que ser descontaminadas son esputo, absceso heces pieza quirúrgica y otros.

En el caso de muestras de orina

Centrifugar las muestras en tubos de 25x150 durante 20 a 30 minutos.

Decantar el sobre nadante

Al sedimento agregar 2 ml de hidróxido de sodio NaOH 4%

Llevar a baño maría o estufa a 37°C por 20 minutos

Sembrar en el medio OGAWA 0.1ml por cada tubo en dos tubos.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

En una cabina de bioseguridad, colocar las muestras debidamente rotuladas en orden creciente poner en una gradilla igual cantidad de tubos estériles de 20x150 con la misma secuencia de las muestras, Hidróxido de Sodio NaOH al 4 % estéril, Pipeta Pasteur, una bandeja de acero inoxidable (dimensiones recomendadas: 60 x 40 x 10 cm) con papel humedecido con fenol al 5% para descartar la muestra y otra bandeja con fenol al 5% para colocar la pipeta Pasteur.

Trasvasar en cada tubo 1 ml. de muestra a cultivar (esputo, absceso, heces, pieza quirúrgica etc). Agregar a cada tubo 4 ml. de hidróxido de sodio NaOH al 4%

Colocar la gradilla con los tubos estériles en el agitador mecánico por 10 minutos

Poner la gradilla con los tubos en estufa o baño maría a 37 C por 20 minutos.

Retirar los tubos de la estufa o baño maría, homogenizar la muestra con la pipeta e inocular 0.1 ml (por tubo) en dos tubos con medio OGAWA, y bañar toda la superficie del medio.

Colocar los tubos en una bandeja de madera de fondo inclinado, con los tapones de algodón ajustados.

Incubar en estufa a 37 °C

Después de 24 horas eliminar los tapones de algodón por las de tapa rosca y ajustar firmemente las tapas a fin de impedir la desecación del medio durante el tiempo de incubación. Además, verificar si algún tubo está contaminado, alcalinizado o acidificado.



Realizar las lecturas a los 7, 15, 30, y 60 días respectivamente.
Los cultivos se dejan hasta las 8 semanas antes de proceder a informar el resultado como negativo
Se debe realizar frotis y coloración Ziehl-Neelsen de las colonias que no tienen morfología típica.

INFORME DE LOS RESULTADOS DEL CULTIVO

Se recomienda la siguiente escala semicuantitativa:

Negativo	(-)	No se observan colonias
Positivo	(N°)	Número total de colonias en el tubo sembrado, si hay menos de 20
Positivo	(+)	De 20 a 100 colonias
Positivo	(++)	Colonias separadas más de 100
Positivo	(+++)	Colonias confluentes (desarrollo en toda la superficie del medio)
Contaminado (C)		Cultivo contaminado

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO: Transporte de las cepas al INS

Las cepas que se envían al INS para:

- ➔ Sensibilidad (convencional y Bactec)
- ➔ Tipificación

Son cepas que tienen que tener más de 30 días y menos de 45 días de sembrada.
Para el transporte de estas cepas se debe sellar con esparadrapo las tapas de los tubos
Acondicionarlos en cajas de cartón resistente o de madera, para evitar roturas y derrames
Indicar con una flecha la posición en que deben mantenerse los cultivos. En la parte inferior de la flecha se coloca el centro de procedencia (Hospital Nacional Víctor Larco Herrera) y en la parte superior de la flecha la dirección correcta del laboratorio de referencia INS.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

➔ Reactivos que se usan para la baciloscopia
Azul de metileno
Fucsina básica
Alcohol ácido

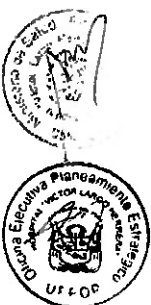
➔ Reactivos que se usan para cultivo

Hidróxido de sodio NaOH 4%
Medio OGAWA

AZUL DE METILENO

SOLUCION MADRE

En un frasco de color ámbar
Colocar 30 gr. De azul de metileno en polvo.



Agregar 1 litro de alcohol puro
Dejar reposar a temperatura ambiente por 24 horas

SOLUCIÓN HIJA

Extraer 100 ml. de solución madre
Agregar 900 ml. De agua destilada

FUCSINA BASICA

SOLUCION MADRE

Extraer 30 gr. De fucsina básica en polvo.
Moler en un mortero mezclando con alcohol puro
Mesclar hasta completar 1 Lt. De alcohol puro con la fucsina
Filtrar
Dejar reposar en estufa a 37C por 24 horas

SOLUCION HIJA

Extraer 100 ml- De fucsina básica madre.
Agregar 900 ml. De fenol al 5 %.

FENOL 5%

Extraer 50 ml. De fenol líquido.
Agregar 950 ml. De agua destilada.

El fenol viene en estado sólido tiene que ponerse en baño maría para poder obtener el estado líquido.

ALCOHOL ACIDO 3%

Extraer 30 ml. De ácido clorhídrico
Agregar 970 ml. De alcohol puro.

MATERIALES Y EQUIPOS

Estufa 37C
Balanza
Autoclave
Matraz de Erlenmeyer x 500 ml
Probeta x 100 ml
Embudo
Beaker x 500 ml
Tubos de prueba 20x125
Baguetas estéril
Gasa estéril

REACTIVOS DE CULTIVO DE MYCOBACTERIUM

MEDIO OGAWA



Es un medio a base de huevos en especial la yema es un constituyente empleado para obtener medios de cultivo ricos en lípidos, por el que las micobacterias tienen especial preferencia. Los medios a base de huevos están, en general, constituidos por soluciones reguladoras a base de fosfatos, ciertos cationes en muy bajas concentraciones, una fuente de carbono (glicerol), otra de nitrógeno (ácido glutámico). Además, se agrega verde de malaquita como inhibidor de la flora asociada, contraste del medio e indicador del pH.

Composición:

Fosfato Monobásico de Potasio KH_2PO_4	3 g.
Glutamato de sodio	1 g.
Glicerol	6 ml
Agua destilada	100 ml
Huevo	200 ml
Verde de Malaquita al 2%	6 ml

Nota. - Los materiales de vidrio a utilizar deberán estar esterilizados.

Preparación de sales

Pesar el fosfato monobásico de potasio y el glutamato de sodio, disolver en agua destilada 100 ml.

Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos o hervir en baño maría por 30 minutos.

Agregar la glicerina.

Dejar enfriar.

Preparación de Verde de malaquita 2%

Verde de Malaquita 2 g.

Agua destilada estéril 100 ml.

Pesar el Verde de Malaquita y poner en un frasco color ámbar.

Agregar el agua destilada y disolver completamente.

Esterilizar a 121 °C x 10 minutos.

Guardar a medio ambiente, utilizar dentro de la semana de su preparación.

Preparación del Medio OGAWA

- Lavar los huevos con agua y jabón, dejarlos secar.
- Limpiar con algodón empapado en alcohol 70%, dejar secar, romper uno por uno los huevos en una placa petri, Observar si se encuentran frescos, vaciar en un Beaker.
- Homogenizar con una bagueta la yema y clara del huevo
- Filtrar en un Beaker utilizando gasa estéril de 4 capas.
- Añadir 6 ml. de la solución acuosa de verde de malaquita al 2% a la solución de sales
- Mezclar con movimientos suaves hasta homogenizar completamente.
- Agregar los huevos filtrados a la solución de sales.
- Mezclar bien y dejar reposar por 30 minutos, para que las burbujas que se hayan formado afloren a la superficie y desaparezcan. Medir el pH del medio 6.2 — 6.4
- Distribuir 6.5 ml en tubos de 20 x 125 mm tapa rosca y 7.5 ml en tubos de 20 x 150 mm evitando la formación de burbujas.



- Colocar los tubos con medio en el coagulador a 90 °C x 60 minutos con las tapas ligeramente flojas
- Retirar los tubos y dejar enfriar a medio ambiente.
- Controlar los medios en estufa a 37 °C por 24 horas, Revisar los medios y ajustarlas tapas.
- Conservar los medios en refrigeración, en una bolsa de plástico, los medios pueden ser usados dentro del mes de su preparación.

PROCEDIMIENTO DE CULTIVO: METODO DE OGAWA - KUDOH

Materiales y Equipos:

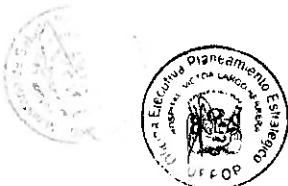
Hidróxido de Sodio NaOH al 4 % estéril
Tubos 20 x 125 con medio Ogawa
Tubos de 25 x 150 con tapa rosca
Pipeta de 10 ml
Pipeta Pasteur
Estufa a 37 °C
Pro-pipeta
Bandeja de acero inoxidable
Solución acuosa de fenol 5%
Baño maría con agitador
Cabina de flujo laminar

Preparación de Solución Hidróxido de Sodio al 4 %

Hidróxido de Sodio 4 g.
Agua destilada 100 ml.
Pesar 4 g. de Hidróxido de Sodio y disolver en 100 ml de agua, destilada, luego esterilizar en autoclave y guardar en frasco a 4 °C, debidamente rotulado.

Procesamiento de las muestras

- En una cabina de bioseguridad, colocar las muestras debidamente rotuladas en una bandeja.
- Trasvasar 1 ml de muestra de esputo a un tubo de 25 x 150 tapa rosca estéril.
- Agregar 4ml de NaOH al 4%
- Poner los tubos en estufa o Baño María a 37 °C por 20 minutos. Retirar los tubos de la estufa o baño María y homogenizar.
- Inocular 0.1 ml en cada uno de los tubos con medio Ogawa, tratando de bañar toda la superficie del medio
- Colocar los tubos con la tapa ajustada, inclinados en una bandeja
- Incubar en estufa a 37 °C.
- Revisar los cultivos a las 48 y 72 horas para observar si existe contaminación.
- Realizar la lectura a los 7, 15, 30 y 60 días respectivamente.



CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO DE OGAWA - INS

1. A partir del mes de mayo de 1997, cada vez que se prepare medio de cultivo para Mycobacterias se anotará la fecha, el N° de lote y la cantidad de tubos preparados. Ej:

Fecha	Lote	N° de tubos
02/05/97	N° 1	55 tubos
2. El laboratorio referencial de micobacterias (INS) solicitará una muestra de 12 tubos de un lote de medios preparados recientemente, con una frecuencia de 1 ó 2 veces al año. Se enviarán los tubos en una caja de material rígido, embalado adecuadamente y protegido para evitar roturas, e indicando la posición en que deben mantenerse durante el transporte. Además, se llenará el FORMULARIO N° 1 (adjunto) con los datos correspondientes.
3. La preparación del lote de medios de cultivo que serán enviados al I.N.S. y el cumplimiento de las disposiciones estarán a cargo del Tecnólogo Medico programado en cultivo de Mycobacterias.

El primer envío se realizará en el mes de mayo y el segundo en el mes de noviembre. Para mayor información, remitirse al manual de Normas para el Control de Calidad de Medios de Cultivo LOWENSTEIN-JENSEN y OGAWA, enviada adjunto al oficio N° 490, con fecha 17/04/97.

ANEXO 5

INFORMES QUE SE REALIZAN: MENSUAL - TRIMESTRAL

INFORME BACIOSCOPICO MENSUAL

DISA.....ESTABLECIMIENTO.....FECHA.....

MUESTRA DE	BACIOSCOPIAS		CULTIVO	
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO



Documento Técnico: Manual Técnico de Procedimientos en Microbiología

	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado
TOTAL								
SINTOMATICO RESPIRATORIO								

PERSONA RESPONSABLE..... FECHA.....

INFORME BACILOSCOPICO MENSUAL

DISA.....ESTABLECIMIENTO.....FECHA.....

MUESTRA DE	BACILOSCOPIAS				CULTIVO			
	NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO	
	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado



SINTOMATICO RESPIRATORIO								
Rx ANORMAL								
EXTRA PULMONAR								
CONTROL DE TRATAMIENTO								
TOTAL								

PERSONA RESPONSABLE..... FECHA.....

INFORME BACILOSCOPICO MENSUAL

DISA.....ESTABLECIMIENTO.....FECHA.....

MUESTRA DE	BACILOSCOPIAS		CULTIVO	
	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO



	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado	Mensual	Acumulado
SINTOMÁTICO RESPIRATORIO								
Rx ANORMAL								
EXTRA PULMONAR								
CONTROL DE TRATAMIENTO								
TOTAL								

PERSONA RESPONSABLE..... FECHA.....

ANEXO 6

CULTIVO Y EXAMEN DIRECTO DE HONGOS

De la obtención de la muestra:



UNAS. - Antes de tomar la muestra de escamas de uñas, es importante tener conocimiento sobre la persistencia del antimicótico en la placa ungueal, la que puede ser de 2 semanas a 6 meses. La afección ungueal puede ocurrir en el lecho ungueal, en la uña misma o en el borde ungueal. Se debe indicar al paciente remover el esmalte de uñas desde 3 a 5 días antes de la toma de muestra.

La toma de muestra para el estudio micológico dependerá del tipo de lesión.

Para escamas de uñas:

- Desinfectar con alcohol al 70%.
- Con el bisturí, hacer un raspado de la placa ungueal afectada, ya sea de la parte incolora o pigmentada o de la uña.
- En algunos casos, se toma la muestra por presión sobre el reborde ungueal o por debajo de él, tratando de recuperar todo el material.
- En la onicomicosis superficial blanca, se raspa las áreas blancas.
- Los fragmentos de uñas, los raspados ungueales deben de ser recolectados en una placa petri estéril, para luego sembrarlos.

PIEL. - Antes de tomar la muestra, indicar al paciente:

Que el día de la toma de muestra no haya usado talcos ni cremas.

Que no haya recibido tratamiento antimicótico en los últimos 5 días, de lo contrario los resultados serán falsos negativos.

Para toma de muestra de escamas de piel:

- Desinfectar la zona de donde se tomará la muestra, utilizando gasa saturada con alcohol al 70% con la finalidad de eliminar contaminantes bacterianos superficiales.
- Las muestras de lesiones de piel deberán obtenerse de los márgenes eritematosos periféricos y de la zona con crecimiento activo si las lesiones son típicas de TIÑA.
- Raspar las escamas de piel utilizando el filo de una hoja de bisturí o el borde de una lámina portaobjetos estéril y recoger en una placa petri estéril. Esta placa debe estar apoyada en forma firme en la piel por debajo del área de donde se va a tomar la muestra.
- Se recomienda tomar muestras de varias lesiones para obtener mayor cantidad de material.
- En caso de lesiones eritematosas húmedas o con exudado, la muestra debe tomarse con bisturí, hisopos, y si hay vesículas romperlas y recolectar en una lámina portaobjetos estéril.

Pitiriasis versicolor. - La Tinea versicolor es una enfermedad de la piel causada por *Malassezia*. La cara y el cuerpo presentan áreas de infección. Estas lesiones son descoloridas en pacientes de piel oscura y de color castaño-amarillentas en pacientes de piel blanca.

Para la toma de muestra:

- Escoger la zona de piel afectada y que tenga bordes de crecimiento activo.
- Humedecer la gasa con alcohol al 70% y desinfectar el área seleccionada.
- Colocar una porción de cinta adhesiva transparente (aprox. 5 cm) sobre la piel afectada, luego colocar estirando y presionando sobre un portaobjetos limpio al que previamente se ha colocado una gota de Azul de lactofenol o Azul de metileno.



PELO. - La afección del cabello o del vello puede corresponder a procesos tipo PIEDRA o a una Tinea. En el primero de los casos se eligen cabellos o vellos donde aparezcan nódulos (se toma la parte distal, no la raíz).

En la *Tinea capitis* y en algunos casos de *Tinea barbae*, la muestra debe incluir tanto cabellos alterados como escamas del cuero cabelludo o la piel.

Para la obtención de los cabellos deben preferirse aquellos que están trancos, opacos y engrosados y que se extraigan fácilmente con una pinza de depilación (extirpar desde la raíz, un mínimo de 8 unidades) y depositarlos en la placa petri estéril.

MUCOSAS. - Las muestras se toman con hisopo; luego se introduce en un tubo de ensayo que contenga 2 ml. de solución salina estéril.

De la Recepción de la Muestra:

1. Constatar que la solicitud de análisis tenga los datos completos, llenados correctamente con letra legible y con firma del médico solicitante. Poner énfasis en anotar la localización de la infección y el tipo de muestra.
2. Que la solicitud esté debidamente sellado y registrado por caja según tarifa vigente o que tenga el trámite de Servicio Social en caso de exoneración o pendiente de pago.
3. Que la muestra tenga cantidad y calidad adecuadas.
4. La toma de muestra se realiza en el sector de Toma de muestras hasta las 10 a.m. Luego se reciben sólo los casos especiales en el Servicio de Microbiología.

Del Procesamiento:

Examen Directo:

- Depositar las muestras de escamas de piel, uñas, pelo o mucosas en una lámina portaobjetos limpia y desengrasada, que contenga una gota de KOH al 10%.
- Cubrir con laminilla cubreobjetos y calentar ligeramente en la llama del mechero.
- Dejar reposar unos minutos.
- Observar al microscopio.

Visualización microscópica: Todos los dermatofitos poseen una morfología similar en su estado parasitario. Cuando se observa con KOH aparecen como filamentos ramificados, tabicados, de 2 a 4 μ m, de ancho. Cuando las hifas van envejeciendo el número de tabiques se multiplica y pueden verse largas cadenas de artroconidias que se desprenden.

Uñas: Se observarán la presencia de hifas, por lo general artrosporados. Algunas veces se observarán levaduras.

Piel: En las escamas de piel se observan las células epiteliales disgregadas y disueltas; confundidas con ellas se busca al hongo, el cual debe observarse tabicado y ramificado.

Pelo: Puede estar parasitado en dos formas Endotrix y Ectotrix.

Cuando se trata de *Malassezia furfur* Se observan esporas (de doble pared) pequeñas, agrupadas en racimos, que presentan filamentos cortos sin tabiques. Su presencia confirma el diagnóstico en el 100% de los casos.



Los resultados positivos al examen directo de hongos (detección de hifas o esporas) deben de correlacionarse con un cultivo positivo.

PROCESAMIENTO DEL CULTIVO DE HONGOS

El cultivo de hongos debe realizarse inmediatamente después de la tomar la muestra a fin de asegurar la recuperación del hongo en los medios de cultivo.

1. La siembra se realiza utilizando el asa de inoculación en ángulo, depositándola en el interior del medio adecuado, para evitar que se sequen.
2. El medio adecuado es el AGAR SABOURAUD con cloramfenicol y el AGAR MYCOBIOTIC. Estos medios permiten el desarrollo de dermatofitos y facilitan su aislamiento. Inhiben hongos saprofitos y mohos.
3. Se incuban a temperatura ambiente (a 37° C para mucosas).
4. Idealmente los cultivos deben observarse diariamente, por lo menos durante la primera y segunda semana de incubación. Si se observan 2 veces por semana son satisfactorios. Los cultivos deben de ser observados hasta por un mes.
5. El desarrollo del hongo es concéntrico, en el centro hay desarrollo estéril y en el borde hay crecimiento activo.
6. Identificación de los hongos:

Es necesario tener en cuenta dos aspectos.

MACROMORFOLOGIA. - En general, el aspecto macroscópico de las colonias de dermatofitos es útil para la identificación de especie. La morfología macroscópica de las colonias varía de acuerdo al medio empleado y a las condiciones ambientales en las que el hongo ha desarrollado.

Criterios para examinar el crecimiento del hongo:

Tipo de micelio. — Observar si es vellosa (cuando hay esporulación) o granular (cuando hay esporulación).

Edad del cultivo.

Tipo de colonias.

Por el pigmento: Ver el color de la colonia tanto en superficie como en el reverso. Ver si hay difusión o no.

Textura de la colonia: Puede ser granular, pulverulenta, lisa algodonosa, cremona o dura.

Tamaño de la colonia: Cubre la placa en forma parcial o total

MICROMORFOLOGIA. - En necesario transferir una pequeña porción de la colonia a un portaobjetos con 1 o 2 gotas de hidróxido de potasio al 10% o en un medio de montaje apropiado. Se debe observar la estructura microscópica del bongo.



La identificación del género y especie depende de la detección y reconocimiento de las conidias y su disposición en las hifas.

Hifas: Tamaño del diámetro, septado o no, pigmento.

Conidióforo: Simple o compleja.

Conidia: Micro (tamaño y forma), Macro (tamaño y forma)

Septas. Presencia de clamidosporas, artrosporas, blastosporas.

Presencia de ascas y ascosporas.

El hallazgo de hifas en raqueta, hifas espiraladas, candelabros fávicos (hifas en asta) y cuerpos pectinados ofrecen la primera clave de que se trate de un dermatofito. Dado que los dermatofitos tienen una propensión particular a hacerse estériles cuando crecen en un medio artificial, deben evitarse la toma de zonas vellosas de crecimiento cuando se hacen montajes para estudio microscópico o cuando se hacen sub—cultivos en otros medios.

Puede ser necesario ampliar a otros medios de cultivo, por ejemplo, medios escasos en nutrientes para favorecer la esporulación como son el agar arroz, agar maíz.

7. Mantenimiento del cepario. - Para evitar la muerte del hongo se debe alternar:
Sabouraud — Agar papa — Sabouraud; o
Sabouraud — Agar arroz - Sabouraud.
El hongo también se puede conservar en agua destilada estéril por 2 años (refrigerado), pero tomando extremas precauciones para evitar la contaminación.



ANEXO 6

FLUXOGRAMA DE MICOSIS SUPERFICIAL

Muestra clínica (piel, pelo, uña)

Examen directo

KOH 10 %

Azul de Lactofenol

Obs. microscópica

Hifas

Levaduras aisladas

Levaduras en racimos

Cultivo

Agar Sabouraud + Cloramfenicol.

Agar Mycosel

Observación macroscópica

Levaduras: Tubo germ (+) *Candida albicans*

(-) Clamid, Asimilación azucares

Micelios:

Si hay espor: Especie

No hay espor: A.ar-Es.

A. Myco-Es.

Observación microscópica:

Género, especie.

