



RESOLUCIÓN DIRECTORAL

Vitarte, 19 de Abril del 2021

VISTO:

El Expediente 20MP-10013-00 que contiene el Informe Nº 343-2020-ALAB/HV, EL Informe Nº 130-2021-ALAB/HV, el Informe Nº 053-2021-UPE/AORG Nº 030/HV y la Nota Informativa Nº 163-2021-AAL-HV;

CONSIDERANDO:

Que, el Título Preliminar de la Ley Nº 26842, Ley General de Salud, establece que, la salud es condición indispensable del desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo. La protección de la salud es de interés público. Por tanto, es responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;

Que, mediante Resolución Ministerial Nº 850-2016/MINSA se aprueba las "Normas de Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", entre sus objetivos específicos señala: que brinda a las instancias reguladoras del Ministerio de Salud una herramienta que facilite el desarrollo de sus funciones normativas; así como, estandarizar los elementos conceptuales, estructurales y metodológicos más relevantes en el ciclo de producción normativa, asimismo, establecer la aplicación de procesos transparentes y explícitos para la emisión de los documentos normativos;

Que, en ese contexto, el Área de Laboratorio mediante Informe Nº 130-2021-ALAB/HV remite a la Unidad de Planeamiento Estratégico, el **Manual Operativo Estandarizado de Microbiología**, para su revisión y posterior aprobación por el ente correspondiente;

Que, en mérito a ello, mediante Informe Nº 052-2021-UPE/AORG Nº 029/HV con fecha de recepción 15 de abril del 2021, la Jefatura de la Unidad de Planeamiento Estratégico sostiene que, el **Manual Operativo Estandarizado de Microbiología**, se encuentra dentro del alcance de la Resolución Nº 850-2016/MINSA, que aprueba el documento denominado "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", y que su aprobación permitirá establecer los procedimientos técnicos para realizar el diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por bacterias, hongos, ácaros, demóides, etc., que afecten a la población que se atiende en el Hospital Vitarte;

Que, en tal sentido, el artículo 11º del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Vitarte, aprobado por Resolución Ministerial Nº 596-2004/MINSA, establece las atribuciones y responsabilidades del Director, entre las cuales se encuentran, la de expedir actos resolutivos en asuntos que sean de su competencia;

Con la visación del Servicio de Apoyo al Diagnóstico, la Unidad de Planeamiento Estratégico y el Área de Asesoría Legal del Hospital Vitarte.

De conformidad con lo dispuesto en la Ley Nº 26842, la Resolución Ministerial Nº 850-2016/MINSA se aprueba las "Normas de Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio





de Salud" y el Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Vitarte, aprobado por Resolución Ministerial N° 596-2004/MINSA, y demás normas pertinentes.



SE RESUELVE:

ARTÍCULO 1º.- APROBAR el Manual Operativo Estandarizado de Microbiología por las consideraciones expuestas en la parte considerativa, cuyo documento en anexo adjunto forma parte integrante de la presente resolución.



ARTÍCULO 2º.- ENCARGAR al Área de Laboratorio del Servicio de Apoyo al Diagnóstico, realice la ejecución de las acciones correspondientes para la difusión, implementación, aplicación y supervisión del mencionado Manual.

ARTÍCULO 3º.- DISPONER al Responsable del Portal de Transparencia y Acceso a la Información Pública, la publicación de la presente Resolución en el portal institucional de la página web.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE

MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL VITARTE
Dra. ROSA G. GUTARRA-VILCHEZ
C.M.P. 82378 R.N.E. 114375
Directora (a)

Distribución:

- () Dirección.
- () Servicio de Apoyo al Diagnóstico.
- () Área de Laboratorio.
- () Interesados.
- () Archivo.



**MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE
MICROBIOLOGÍA**

2021



ÍNDICE

I. FINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN TÉCNICA	6
II. OBJETIVOS	6
III. ÁMBITO DE APLICACIÓN	6
IV. BASE LEGAL	6
V. DISPOSICIONES GENERALES	7
5.1 DEFINICIONES	7
VI. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS	9
6.1. Condición para la obtención de muestras	9
6.2. Criterio para rechazo de muestras	10
6.3. PROCEDIMIENTO: UROCULTIVO	11
6.3.1. Fase pre-analítica	11
A. Toma de muestra	
B. Transporte de la muestra	
C. Preparación de la muestra	
6.3.2. Fase analítica	12
A. Sedimento urinario	
B. Coloración Gram	
C. Cultivo de orina	
D. Lectura de los medios de cultivo	
E. Interpretación de los resultados	
F. Reporte de resultados	
6.4. PROCEDIMIENTO: COPROCULTIVO	16
6.4.1 Agentes etiológicos del EDA	16
6.4.2 Fase pre-analítica	17
A. Tipo de muestra y obtención	
6.4.3. Fase Analítica	18
A. Examen Macroscópico de heces	
B. Siembra primaria	
C. Sub-cultivos	
D. Lectura de placas	
E. Identificación	
6.5. PROCEDIMIENTO: HEMOCULTIVO	22
6.5.1. Fase pre-analítica	23
A. Preparación de la piel	
B. Preparación de los frascos	
C. Venopunción e inoculación del frasco	
D. Número e intervalo de las extracciones	
E. Volumen y dilución de la sangre	
F. Incubación Sistema automatizado BacT/Alert	
G. Preparación de la piel	
H. Preparación de los frascos	



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

I.	Venopunción e inoculación del frasco	
J.	Número e intervalo de las extracciones	
K.	Volumen y dilución de la sangre Incubación: Sistema automatizado BacT/Alert	
6.5.2	Fase Analítica	28
A.	Subcultivos de hemocultivos positivos	
B.	Lectura de subcultivos	
6.6.	PROCEDIMIENTO: CULTIVO DE SECRECIONES	29
6.6.1	Muestra de dispositivos intravasculares o catéteres	29
A.	Fase Pre-analítica	
B.	Fase Analítica	
6.6.2	Muestra de herida operatoria con hisopo	30
A.	Fase Pre-analítica	
B.	Fase Analítica	
6.6.3	Muestra de tracto respiratorio superior	31
A.	Fase Pre-analítica	
B.	Fase Analítica	
6.6.4	Muestra de tracto respiratorio inferior	33
A.	Fase Pre-analítica	
B.	Fase analítica	
B.1.	Cultivo de aspirado trans traqueal	
B.2.	Cultivo de cepillado bronquial	
B.3.	Cultivo de lavado broncoalveolar	
6.6.5	Muestra secreción vaginal	35
A.	Fase pre analítica	
B.	Fase analítica	
6.6.6	Muestra de secreción endometrial	36
A.	Fase pre analítica	
B.	Fase analítica	
6.6.7	Muestra de secreción ocular	37
A.	Fase pre analítica	
B.	Fase analítica	
6.6.8	Muestra de origen intra abdominal	39
A.	Fase pre analítica	
B.	Fase analítica	
6.7.	PROCEDIMIENTOS PARA LA REALIZACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA	41
A.	Valores críticos del Antibiograma	
B.	Inoculación	
C.	Aplicación de los discos	
D.	Incubación	
E.	Lectura de las placas e interpretación de resultados	
F.	Clasificación de los antibióticos disponibles en el Perú	
6.8.	PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA MAPEO MICROBIOLÓGICO	49



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

6.8.1. Control Microbiológico del aire: Quirófanos y otras unidades	50
6.8.2. Control microbiológico de áreas, otras unidades y colonización de las manos	51
6.9. PROCEDIMIENTO: HONGOS, ACAROS Y DEMODEX	54
6.9.1. Fase pre analítica: Indicaciones para la toma de muestra	
6.9.2. Fase analítica	
A. Investigación de Demódex	
B. Investigación de Hongos	
C. Investigación de Ácaros	
D. Cultivo de Hongos	
E. Prueba del Tubo Germinativo	
6.10. DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS POR BACILOSCOPIA	57
6.10.1. Muestra de esputo	
6.10.2. Muestra extrapulmonar	
6.10.3. Recepción de muestras al laboratorio	
6.10.4. Preparación y fijación del extendido	
6.10.5. Tinción Ziehl Neelsen	
6.10.6. Observación microscópica y lectura de extendidos	
6.10.7. Descontaminación y desecho del material	
VII. RESPONSABILIDADES	66
VIII. ANEXOS	66
IV. BIBLIOGRAFÍA	79



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

I. FINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN TÉCNICA

La finalidad del manual es establecer los procedimientos técnicos para realizar el diagnóstico bacteriológico de las infecciones causadas por bacterias, bacilos, hongos, ácaros, demódx (otros) que afectan a la población que se atiende en el Hospital Vitarte y con ello establecer la estandarización realizada en los procedimientos aplicados en Microbiología, contribuyendo también a un mejor manejo del sistema de gestión de calidad y control de calidad analítico, para lo cual logramos el compromiso del personal en cumplir lo establecido y mejorar continuamente los servicios que brindamos.

II. OBJETIVOS

- El presente manual tiene por objetivo establecer los procedimientos técnicos para realizar el diagnóstico microbiológico de las infecciones causadas por bacterias, hongos, ácaros, demódx, etc. Que afecten a la población que se atiende en el Hospital Vitarte.
- Brindar la estandarización de los procesos en la realización de cada examen solicitado.
- Controlar y Disminuir los errores en la fase analítica los cuales podrían tener consecuencias potencialmente negativas para el paciente.
- Crear consciencia y compromiso del personal que labora en Microbiología para lograr un trabajo de excelencia y en conjunto dar pasos hacia la mejora continua.

III. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente manual está dirigido a todo el personal que labora en Microbiología del Área de Laboratorio - Servicio Apoyo al Diagnóstico del "Hospital Vitarte" para su aplicación correspondiente a la labor desempeñada.

IV. BASE LEGAL

- Ley N° 26842, Ley General de Salud.
- Decreto Ley N° 1161 que aprueba la ley de organización y Funciones del Ministerio de Salud.
- Resolución Ministerial N° 850-2016-MINSA "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud".
- Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). Serie de Normas Técnicas N°15. Primera Edición: 1995.
- Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos "Bioseguridad en laboratorios de ensayo. biomédicos y clínicos". Serie de Normas Técnicas N°18. Tercera Edición: 2005.
- Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Serie de Normas Técnicas N°28. Primera Edición -2001.

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

V. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 DEFINICIONES

- **ITU:** Infección del tracto Urinario.
- **Bacilos Gram negativos:** Son aquellos que no fijan el Colorante Cristal Violeta porque poseen la capa de lipopolisacáridos (péptido glicano). Este tipo de bacilos es asociado a bronquiectasias (*Pseudomonas* sp.), OCFA (*Moraxela catarrhalis*), y alcoholismo o diabetes (*Klebsiella* sp.).
- **Bacilos Gram positivos:** Aquellos que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, esta característica se da por la composición química de su membrana celular.
- **Orina:** Secreción líquida de color amarillo que es secretada por los riñones como resultado de la depuración y el filtrado de la sangre, se acumula en la vejiga y se expulsa por la uretra.
- **Microbiota intestinal:** es el conjunto de bacterias que viven en el intestino, en una relación de simbiosis tipo comensal o como también mutualismo. La gran mayoría no son dañinas para la salud y muchas son beneficiosas.
- **Chorro medio:** Es la muestra de elección para Urocultivo. El tiempo de retención deseado es por lo menos 3 horas. Luego de la higiene de genitales, se elimina el primer chorro y se recolecta en frasco estéril la fracción siguiente.
- **Sonda Foley:** son tubos flexibles, generalmente de látex, que, en la cateterización urinaria, se pasan a través de la uretra y hacia dentro de la vejiga con el propósito de drenar la orina. Quedan retenidos por medio de un globo en la extremidad del catéter que se infla con agua estéril.
- **Catéter vesical:** es una sonda que se introduce a través de la uretra al interior de la vejiga urinaria con fines diagnósticos y terapéuticos. El procedimiento es invasivo y potencialmente traumática a las estructuras de las vías urinarias estériles, a excepción de la parte final de la uretra que se considera no estéril. Se considera un alto riesgo de infección del trato urinario el procedimiento por lo que se valora la necesidad de realizarlo y con técnica estrictamente estéril.
- **Cultivo:** es un método para la multiplicación de microorganismos, es empleado como método fundamental para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades.
- **Aspiración supra púbica:** es un procedimiento invasivo rápido, simple y seguro para el diagnóstico correcto de infección urinaria que consiste en obtener una muestra de orina mediante la punción con una aguja a través de la parte baja de la pared abdominal donde se encuentra la vejiga urinaria.
- **Criterios de rechazo:** son criterios básicos para rechazar muestras inadecuadas, no útiles para obtener resultados confiables.
- **Medios de cultivo:** es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. Para realizar un cultivo se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- **Coloración Gram:** método de tinción descrito por vez primera por el médico Christian Gram, en 1884 utilizado para teñir las bacterias y poder diferenciarlas en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas.
- **Colonia:** Es una población de células que puede observarse macroscópicamente (a simple vista) y que crecen en un medio nutriente (sólido), procedente de una sola célula.
- **Inóculo:** Es una suspensión de microorganismo vivo que se han adaptado para reproducirse en un medio específico. Gérmenes de todo tipo disponibles para una contaminación.
- **Cultivos anaeróbicos:** estos medios contienen alta proporción de peptonas e hidratos de carbono porque su metabolismo es más exigente y requieren además factores de crecimiento como la hemina y vitamina K. Estos cultivos están preparados para microorganismos que obtienen su energía a través de reacciones que no implican el uso de oxígeno molecular y para los cuales el oxígeno molecular actúa como toxico celular o como inhibidor del crecimiento son microorganismos anaerobios obligados.
- **Susceptibilidad antimicrobiana:** la prueba más difundida por ser simple y económica, mediante difusión de en discos de papel. Estos discos son preparados comercialmente en forma estandarizada con las concentraciones de principio activo necesarias de antibióticos. Los discos son colocados sobre la superficie de agar de una placa Petri, que ha sido previamente inoculada con una cantidad estandarizada del germen cuya susceptibilidad se desea medir (es una cantidad que oscila aproximadamente en las 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro de inóculo). Terminado el proceso la placa se coloca en la estufa de cultivo y comienza el crecimiento de la bacteria y a su vez la difusión del antibiótico desde el disco de papel. El antibiótico se aleja del disco según un gradiente de dilución, por lo que, a mayor distancia, menor concentración. Esto causa el halo de inhibición circular que se forma, cuyo diámetro será directamente proporcional a la potencia del antibacteriano frente a la bacteria inoculada e inversamente proporcional a la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente antimicrobiano.
- **Urocultivo:** Estudio microbiológico que consiste en realizar un cultivo de orina con el fin de identificar el germen causal de una infección urinaria.
- **Cultivo mixto:** Es un cultivo que contiene más de una clase de microorganismo
- **Coprocultivo:** Es un análisis bacteriológico realizado en la muestra de heces. La muestra es recolectada en un recipiente y se cultiva para determinar la presencia de un agente causante de una infección bacteriana.
- **Medios selectivos:** es un medio de cultivo en el que solo puede crecer un tipo de microorganismo (hongo, bacterias entéricas, protozoos, etc.). Estos medios generalmente tienen inhibidores de crecimiento para ciertos microorganismos.
- **EDA:** Enfermedad Diarreica Aguda. Con alta incidencia mortal en niños menores de 5 años. Antes la deshidratación era causante de muertes pediátricas, ahora las muertes también son relacionadas a infecciones bacterianas septicémicas.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- **Siembra primaria:** Cuando el material es inoculado en los medios de cultivo por primera vez.
- **Hemocultivo:** Es un cultivo microbiológico de la sangre. Es un método diagnóstico usado para detectar infecciones por bacterias (bacteriemias) u hongos en la sangre.

VI. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

En la realización de cada examen bacteriológico solicitado se llevarán a cabo tres fases: Fase Pre analítica, Fase analítica y Fase Post analítica (transcripción de resultados).

Los Procedimientos que realizamos en el Laboratorio del Hospital de Vitarte son: Urocultivo, Coprocultivo, Hemocultivo, Cultivo de Secreciones, cultivo de líquidos corporales, examen directo y cultivo de hongos, examen directo de ácaros, pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, Baciloscopia, etc.

6.1. CONDICIONES PARA LA OBTENCION DE MUESTRAS:

- ✓ Antes de recoger la muestra, considerar el riesgo/beneficio de la recogida de la muestra para el paciente.
- ✓ La muestra debe transportarse en envases estériles adecuados con cierre hermético a prueba de fugas.
- ✓ La obtención de la muestra deberá realizarse en condiciones de máxima asepsia, evitando contaminaciones ambientales, del personal, del propio enfermo a la muestra y viceversa.
- ✓ La muestra debe rotularse con los apellidos y nombres del paciente, el tipo de muestra y la fecha de recogida. En determinados casos será importante precisar la hora de recogida.
- ✓ Se debe obtener una cantidad de muestra adecuada a la prueba solicitada. En ocasiones una escasa cantidad de muestra puede ser la causa de falsos negativos.
- ✓ La muestra se deberá recoger, siempre que sea posible, antes de iniciar cualquier terapia antimicrobiana.
- ✓ Se debe evitar, siempre que sea posible, el contacto de la muestra con microbiota normal del paciente, con el objeto de asegurar que la muestra refleje lo mejor posible el lugar de la infección.
- ✓ El envío de la muestra al laboratorio de microbiología debe ser lo más rápido posible con objeto de asegurar la supervivencia de microorganismos de difícil crecimiento y de evitar el sobrecrecimiento de la microbiota normal, acortar el tiempo de contacto con anestésicos locales o con otras sustancias con acción antimicrobiana utilizadas en la recogida de la muestra.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

6.2. CRITERIOS PARA RECHAZAR MUESTRA

- a. Muestra sin rotular o mal rotulada (la identificación de la muestra no corresponde a los datos del paciente en la solicitud de análisis).

En cualquier caso, se contactará con el servicio peticionario haciéndole conocer la necesidad de que procedan a la correcta identificación de la muestra. Si se puede recoger otra muestra, se solicitará nuevamente. Dependiendo de la importancia de la muestra, se puede optar a su procesamiento antes de la correcta identificación con el objeto de que no se deteriore la misma.

- b. Muestra que tenga evidencias de haber sido derramada.

Se procederá a solicitar una nueva muestra. En el caso de no ser posible la recogida de una nueva muestra, desinfectar externamente el envase o trasvasar la muestra a un contenedor estéril. En este caso, se indicará en el informe que la muestra estaba derramada y que los resultados deben ser interpretados con la debida precaución.

- c. Hisopos de secreciones sin medio de transporte, cuando haya ocurrido más de 1 hora desde el momento de la toma de muestra.

En el caso de muestras que no se puedan volver a recoger (por ejemplo: muestras quirúrgicas) se puede optar por procesarlas informando por escrito al servicio solicitante de la incidencia en la recogida/transporte de la muestra y alertando de que los resultados obtenidos deben ser interpretados con la precaución correspondiente. En el caso de que el transporte deficiente invalide totalmente el estudio microbiológico (por ejemplo, muestras en formol) no se aceptaran estas muestras y se comunicará al servicio solicitante.

- d. Recipiente o contenedor inadecuado. Por ejemplo, frasco no estéril para cultivo, muestra de secreción en jeringa, aspirados contenidos en la sonda, etc.

- e. No indicar tipo de muestra / tipo de examen en la solicitud de análisis.

Para el caso de pacientes internados, se contactará con el servicio solicitante haciéndole conocer la necesidad de identificar el tipo de análisis / tipo de muestra y la localización anatómica de la cual fue obtenida.

Si se puede recoger otra muestra, se solicitará nuevamente. Dependiendo de la importancia de la muestra, se puede optar a su procesamiento antes de la correcta identificación con el objeto de que no se deteriore la misma.

- f. Muestra visiblemente contaminada, mal tapadas o sin tapa.

- g. Muestra de orina para urocultivo con más de 2 horas de haber sido emitidas conservadas o transportadas a temperatura ambiente (se procesará en caso no es posible obtener una nueva muestra o en caso el paciente debe iniciar prontamente el tratamiento antimicrobiano)

- h. No se procesarán muestras para urocultivo sin previo aseo del (a) paciente.

- i. El paciente no cumplió con las indicaciones dadas para la correcta recolección de las muestras dependiendo del tipo de examen, ejemplo: ayunas, sin higiene, con higiene, etc.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

6.3. PROCEDIMIENTO: UROCULTIVO

6.3.1. Fase pre analítica

A. Toma de muestra:

Muestra obtenida del chorro medio

Preparación en mujeres

- Proceda primero a lavarse las manos y luego siéntese en el inodoro lo más hacia atrás que pueda; separe los labios genitales con una mano y mantenga los pliegues separados y proceda a asearse toda la zona genital con jabón y enjuague con abundante agua; seque con papel.
- Proceda a recoger la orina destapando previamente el frasco estéril tapa rosca boca ancha en el momento de la micción y sin tocar con los dedos su interior, recoja solo la muestra del chorro medio es decir ni la primera ni la última parte del chorro de orina, no llene el frasco.
- Colectar la primera orina de la mañana salvo indicación médica; El paciente debe llenar su nombre y apellido completo en la etiqueta del frasco.

Preparación en varones

- Proceda primero a lavarse las manos y luego la cabeza del pene empezando por la abertura uretral y continúe en dirección a usted; si no está circundado retraer el prepucio. Enjuagar con agua y secar con papel. Destape el frasco estéril tapa rosca boca ancha en el momento de la micción y sin tocar con los dedos su interior, recoja solo la muestra del chorro medio es decir ni la primera ni la última parte del chorro de orina, no llene el frasco.
- Colectar la primera orina de la mañana salvo indicación médica El paciente debe llenar su nombre y apellido completo en la etiqueta del frasco.

Muestra por sonda Foley

- Limpiar con algodón embebido en alcohol la porción distal de la sonda.
- Usando una aguja y jeringa, colectar la orina a través de la sonda y colocar su contenido en un frasco estéril. No obtener orina a partir de la bolsa colectora por que suele estar contaminada.

Muestra obtenida a través de una sonda estéril recién colocada

- Aprovechando la colocación o el cambio de sonda, se recoge directamente a orina que fluye por el extremo distal de la sonda nueva en un frasco estéril. Si se trata de un recambio de sonda es importante considerar la posibilidad que se produzca la resuspensión de bacterias de la zona uretral en la orina vesical. Esto puede resultar en la presencia transitoria de bacterias colonizantes de la sonda previa en la orina y dar lugar a cultivos falsamente positivos. En estos casos es recomendable una nueva muestra posteriormente.

Muestra por catéter vesical



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Un catéter vesical es insertado por un profesional de la salud, para obtener orina directamente de la vejiga.
- Este procedimiento debe ser realizado con una técnica aséptica, para evitar el riesgo de introducir microorganismos en la vejiga.
- Desechar los 15 a 30 ml iniciales de orina y enviar el chorro siguiente para el cultivo.

Muestra por aspiración suprapúbica

- Directamente de la vejiga, es realizada por el médico o personal de salud entrenado. Este método es el preferido para niños, para pacientes en los cuales la interpretación de los resultados de orina emitida es difícil, o cuando se sospechan bacterias anaerobias como causa de la infección.
- La vejiga debe estar llena y palpable antes de la aspiración.
- Desinfectar la piel sobre la vejiga.
- Hacer una punción a través de la epidermis encima de la sínfisis pubiana.
- Aspirar usando una aguja y jeringa. Coloque la muestra de orina en un recipiente estéril antes de su envío al laboratorio.

B. Transporte de la muestra

- La orina debe ser transportada inmediatamente al laboratorio después de su obtención, pudiendo permanecer a temperatura ambiente hasta 2 h, Si la orina no puede ser procesada se puede conservar hasta 24 h en refrigeración después de su obtención.
- NO CONGELAR la muestra.

C. Preparación de la muestra:

El procesamiento de la muestra debe realizarse dentro de las primeras dos horas de emitida la muestra. Después de las dos horas el deterioro que experimenta la muestra de orina incluye: destrucción de leucocitos y eritrocitos, proliferación de bacterias, degradación bacteriana de la glucosa, aumento del pH por formación de amoníaco como resultado de la degradación bacteriana de la urea, y oxidación de la bilirrubina y del urobilinógeno.

6.3.2. Fase analítica

Materiales

- Agar Sangre
- Agar Mac Conkey
- Aga Mueller Hinton
- Cepa Bacillus subtilis
- Escala Mac Farland 0.5
- Reactivos de Coloración de Gram
- Asa de 1 µl para detección de recuento de colonias mayores de 1,000 UFC/ml.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Asa de 10 µl para la detección de recuento de colonias entre 100 y 1,000 UFC/ml.

A. Sedimento urinario:

Homogenizar la muestra por inversión del frasco, Se invierte lenta y cuidadosamente, de tres a cinco veces para lograr una buena mezcla sin formar espuma.



No es recomendable homogenizar la muestra girando el frasco, ya que origina remolinos que resultan en el depósito de los elementos formes pesados en el fondo del frasco.



- Centrifugar 10 ml de orina x 5 min. a 400 g este procedimiento debe estar estandarizado para dar resultados confiables.
- Se vuelca el sobrenadante de modo que quede aproximadamente 0.5 mL del sedimento.
- Se resuspende por agitación en ese volumen de líquido y se observa entre la lámina porta y cubre objetos en el microscopio con un aumento de 400X
- Se deberá consignar la presencia de leucocitos, hemáties, bacterias, cilindros (especialmente los cilindros leucocitarios), tipos de cristales y células. Se informará el recuento respectivo.

B. Coloración de Gram:

Se recomienda la realización de la coloración Gram en pacientes que están recibiendo antibióticos y pacientes que presentan sedimento patológico con cultivos negativos, para verificar la presencia de microorganismos exigentes. En este sentido, debe considerarse además la realización de una coloración Ziehl Neelsen del sedimento de la orina, aunque su sensibilidad en casos de tuberculosis renal es inferior al 10%.

Existe un procedimiento que consiste en: colocar 10 µl de orina bien mezclada sin centrifugar sobre una lámina portaobjetos, dejar secar al aire sin extenderla, realizar la coloración Gram a fin de determinar el número de organismos por campo de aceite de inmersión. Un organismo observado a 1000x correlaciona con un recuento de colonias de 10^5 / en 1ml de orina. Sin embargo, este procedimiento carece de sensibilidad puesto que se sabe muchas infecciones urinarias cursan con recuentos de ≤ 10000 UFC/ML.

C. Cultivo de orina: Inoculación para el recuento de colonias e incubación

- El cultivo debe realizarse de la orina sin centrifugar.
- Homogenizar el frasco con la muestra de orina por inversión con movimientos suaves para evitar la formación de espuma.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Introducir un asa descartable calibrada de 1ul inmediatamente por debajo de la superficie líquida y ascenderla verticalmente.
- Una vez tomada la muestra se lleva en todo su volumen a la superficie del agar haciendo una estría a través del centro. El inóculo se disemina en ángulos rectos respecto a la estría primaria diseminando el inóculo hasta cubrir toda la superficie de tal forma que se obtengan colonias aisladas para reducir al mínimo los resultados falsos negativos de los cultivos
- Usar las placas correspondientes para las muestras de orina emitidas por chorro medio y los obtenidos por catéteres, cultivar 1 µl o 10 ul de orina.
- Los medios utilizados para el cultivo de orina son el Agar Sangre y el agar Mc Conkey.
- Los cultivos de orina deben ser incubados a 35-37°C en atmosfera aeróbica antes de ser interpretados. La mayoría de bacterias causantes de infección urinaria se pueden poner en evidencia en 18-24 horas, en este contexto no tiene sentido prolongar la incubación más allá de las 24 horas. En casos determinados, bacterias exigentes, deficientes o cultivo negativo o cuando se documenta la presencia de bacterias en la tinción de Gram podrá ser necesario extender el periodo de incubación a las 48 horas
- **Prueba de actividad inhibitoria:** Determinar la prueba de actividad inhibitoria en la orina sin centrifugar (Anexo1)

D. Lectura de los medios de cultivo:

- Examinar los cultivos que han sido incubados durante toda la noche, pero hacer la lectura final a las 24 hrs.
- Cuando hay presencia de pequeñas o escasas colonias que son apenas perceptibles o la muestra es colectada por una técnica invasiva como aspiración suprapúbica. incubar hasta por 48 horas.
- Para la cuantificación y tipo morfológico de los organismos presentes:
 - ✓ asa de 1 µl, una colonia equivale a 1,000 UFC/ml. (10^3)
 - ✓ asa de 10 µl, una colonia equivale a 100 UFC / ml. (10^2)
- Determine el recuento de colonias de cada morfotipo en el cultivo por separado examinando los agares.
- No identificar microbiota urogenital normal a nivel de género o de especie.
- Para la identificación final proceder de acuerdo a métodos establecidos en el laboratorio. (Anexo 2)
- Realizar pruebas de susceptibilidad de acuerdo a métodos establecidos en el laboratorio. (véase en la sección Susceptibilidad Antimicrobiana)
- Mantenga las muestras de orina en refrigeración por lo menos 24 horas para resolver cualquier problema con la muestra o resultados del cultivo.

E. Interpretación de los resultados:



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Los criterios clásicos de interpretación descritos por Kass en los que se consideran significativos recuentos de $>10^5$ UFC/mL pueden ser aplicados a la mayoría de las muestras en las que se solicita el cultivo. Sin embargo, en determinadas circunstancias se admite la existencia de infección urinaria con recuentos muy inferiores como son:

- En orinas obtenidas por punción suprapúbica o que proceden del riñón, cualquier recuento es indicativo de infección.
- En mujeres jóvenes con síndrome miccional y leucocituria, se considera significativo el hallazgo de $>10^2$ UFC/ml.
- En varones en los que la obtención de orina es menos susceptible de contaminarse, son significativos recuentos de $\geq 10^3$ UFC/ml.
- En orinas obtenidas por sondaje vesical, se consideran significativos recuentos $\geq 10^3$ UFC/ml de cualquier microorganismo en cultivo puro.

En situaciones diferentes a las anteriormente descritas, un recuento $\leq 10^4$ UFC/ml se considera como no significativo. Recuentos bajos ($\leq 10^4$ UFC/ml) de microorganismos normalmente encontrados en la piel o genitales externos o internos se consideran como contaminantes.

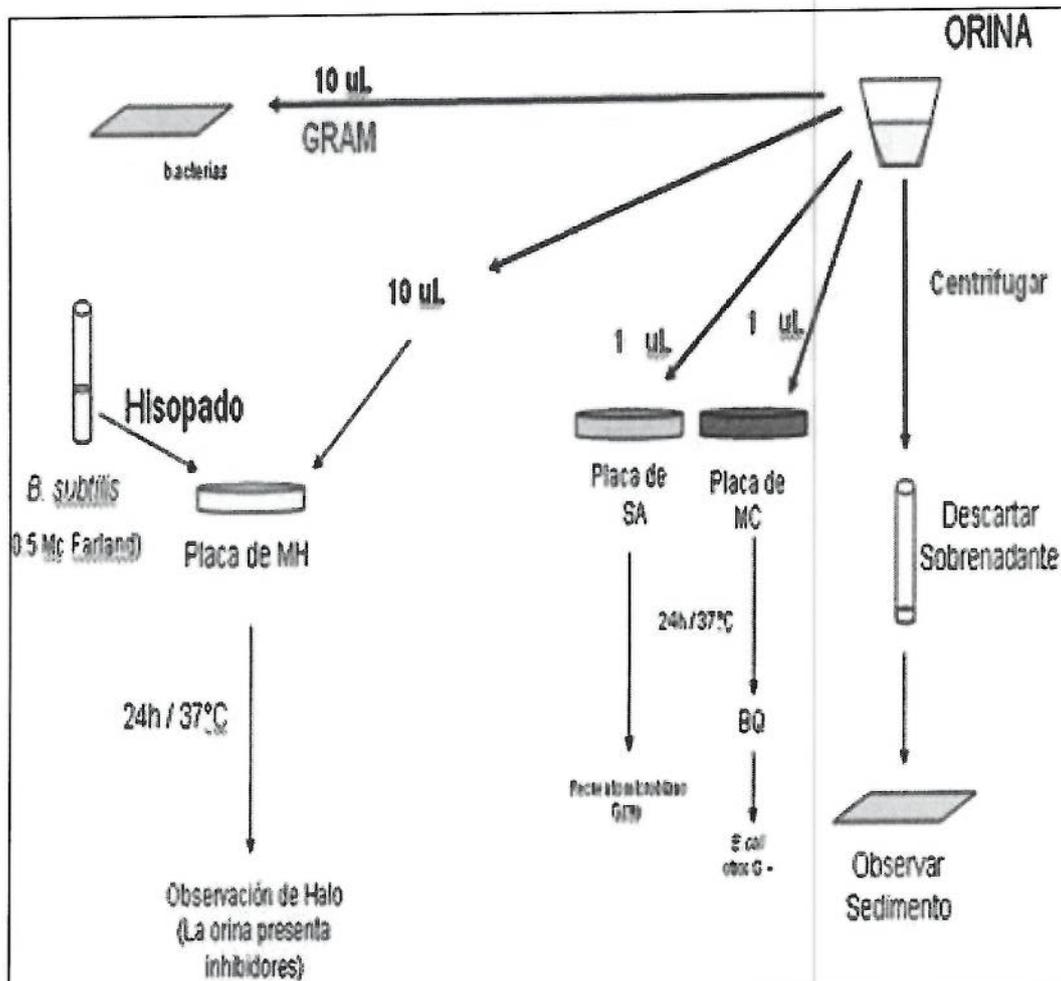
Los cultivos de crecimiento mixto en pacientes con infección urinaria no complicada adquirida en la comunidad, probablemente indican contaminación de microbiota fecal y se pueden informar como "Microbiota mixta; posible contaminación. Sugerimos una recogida apropiada de la orina, con una entrega a tiempo al laboratorio, si existe una indicación clínica". Sin embargo, estos cultivos mixtos en pacientes sondados, hospitalizados o en pacientes mayores de >65 años deben ser valorados con cautela y en algunas ocasiones requieren contactar con el clínico para realizar una correcta interpretación.

F. Reporte de resultados

- Informar los resultados de la coloración Gram y sedimento.
- Resultados Negativos: Si no se observa crecimiento sobre todos los medios de cultivo, reportar "Urocultivo negativo". Si solamente se observa microbiota urogenital o de la piel, reportar como cultivo negativo y el recuento será de 10 000 UFC/ml de microbiota.
- Resultados Positivos: los cultivos mixtos con morfotipo bacteriano presente se reporta como posible contaminación y se sugiere "nueva muestra".
- Reportar el recuento de colonias de cada patógeno por separado, seguida por la identificación y resultados de la prueba de susceptibilidad.
- Mantener copia de los resultados en sistema manual o electrónico.



Esquema de trabajo de Urocultivo



6.4. PROCEDIMIENTO: COPROCULTIVO

La porción inferior del intestino tiene una flora bacteriana normal excesivamente amplia. Los microorganismos con mayor prevalencia son los anaerobios (*Bacteroides*, bacilos Gram positivos, estreptococos), microorganismos entéricos Gram negativos y *S. faecalis*. Para poder aislar bacterias patógenas de las heces implica la separación de las especies no patógenas, usualmente a través del empleo de medios selectivos diferenciales y de cultivos enriquecidos.

Las principales causas de trastornos gastrointestinales agudos incluyen a los virus, las toxinas (de estafilococos, vibriones, *Escherichia coli* toxigena), bacilos entéricos Gram negativos invasores, los fermentadores lentos de la lactosa, las *Shigellas*, las *Salmonellas* y *Campylobacter*.

6.4.1 Agentes etiológicos de EDA

La diarrea infecciosa se origina por la multiplicación de microorganismos a nivel del tubo digestivo, los que actúan por mecanismos: invasivos, toxigénicos, o mixto.

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Diarrea Secretoria (No inflamatoria)

Se caracteriza generalmente por deposiciones líquidas abundantes, sin sangre, ni moco, ni pus: *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139, *E. coli* Enteropatógena, *E. coli* Enterotoxigenica, *Clostridium difficile*, *Plesiomonas shigelloides*.

Diarrea inflamatoria (Invasiva)

Se caracteriza por deposiciones muy frecuentes de escaso volumen, con presencia de moco y/o sangre, por lo general con abundantes leucocitos en las heces: *Salmonella spp* (mixta), *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* no O1, no O139, *E. coli* Enteroinvasiva, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* Enterohemorrágica O157, *Aeromonas spp* (mixta), *Vibrio parahaemolyticus* (mixta)

6.4.2 Fase pre analítica

A. Tipo de muestra y obtención:

• Heces:

- Examen directo, respuesta inflamatoria, coloración Gram y cultivo.
- Las muestras fecales deben ser obtenidas en frascos estériles con boca ancha y tapa hermética, previo al suministro de antimicrobianos, o luego de tres días de haber dejado de tomarlo.
- Si la muestra de heces no puede ser cultivada en un lapso de 1 a 2 horas, se debe escoger una muestra representativa (mucus, pus, sangre) con un hisopo con punta de algodón y colocarlo en un medio de transporte Cary Blair.
- Evitar usar papel higiénico para la colección, este puede estar impregnado con sales de bario que son inhibitorias para algunos patógenos intestinales.
- En el caso de infantes se recomienda no usar pañales absorbentes, si no de tela, para obtener la muestra; tomar una porción de las heces, escoger la que muestre moco y/o sangre y colocarla en medio de transporte Cary Blair.
- Las muestras en medio de transporte pueden aceptarse hasta en 4 horas de la toma.

• Hisopado rectal

- La muestra se obtiene con un hisopo con punta de algodón o de dracón, estéril, el cual después de haberle sacado la protección de papel, se acondicionará previamente sumergiéndolo en el espesor del medio Cary Blair.
- Luego se introducirá en el recto unos 3 cm, realizando movimientos de rotación, se tratará de obtener el material mucoso que se encuentra en las paredes de la ampolla rectal.
- Colocar el hisopo dentro del medio de transporte
- Enviar al laboratorio hasta en 4 horas o menos.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

6.4.3 Fase analítica

A. Examen macroscópico de heces

- Color: Marrón, amarilla, verdosa, etc.
- Aspecto: anotar la consistencia de las heces que puede ser dura, pastosa, semilíquida, o líquida.
- Presencia de moco, pus o sangre que indicarían la presencia de un patógeno invasivo.
 - Moco: Presente (+, ++, +++) o ausente (-)
 - Sangre: Presente (+, ++, +++) o ausente (-)

Detección de Leucocitos Fecales: Se coloca una pequeña porción de muestras fecales sobre una lámina porta objetos con una gota de colorante azul de metileno y otra con suero fisiológico.

- Mezclar la suspensión totalmente, cubrir con una laminilla y examinar al microscopio después de esperar 2 ó 3 minutos para que los leucocitos adquieran buena tinción nuclear.
- Observar al microscopio a 40X.
- Identificar los leucocitos, diferenciar y hacer un recuento de PMN y MN.

B. Siembra primaria

- La superficie del medio de cultivo a usar debe estar completamente seca antes de proceder a la siembra
- Si la muestra es de heces, tomar una pequeña porción con la ayuda de un asa descartable estéril y realizar estrías sobre el agar a fin de obtener colonias aisladas.
- Si la muestra está dentro de un medio de transporte, con el hisopo dejar una porción de la muestra en el primer cuadrante de la placa, y con el asa estéril proceder a hacer estrías por agotamiento en toda la superficie de la placa.
- Colocar aproximadamente 1 gr. de muestra en tubos conteniendo 10 mL de Caldo Selenito y Agua peptonada alcalina. Incubar el primero a 35-37°C por 12 ó 24 horas y el segundo por 18 horas a temperatura ambiente o a 35-37°C por 8 horas.
- Los medios a utilizar son: Agar XLD, TCBS, Mac Conkey con sorbitol, caldo selenito, agar SS (*Salmonella* y *Shigella*)
- Incubar a 35 – 37°C por 18 a 24 horas.

C. Sub-cultivos

Subcultivar el crecimiento bacteriano de los tubos de Selenito y Agua peptonada en los medios de cultivo apropiados: Agar SS y Agar TCBS e incubar por 18 a 24 horas y 35-37°C.

D. Lectura de placas



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Crecimiento en Agar SS: Medio empleado para la detección de *Salmonella* y *Shigella*, ambos lactosa negativa. La mayoría de cepas de *Salmonella* presentaran el centro de sus colonias de color negro debido a la producción de H₂S.
- Crecimiento en agar XLD: La producción de hidrógeno sulfurado se observa como un precipitado de color negro en la colonia.
- Las bacterias que descarboxilan la lisina a cadaverina pueden ser reconocidas por la apariencia de una coloración púrpura alrededor de las colonias debido a un incremento en el pH.
- Estas reacciones pueden producirse simultáneamente o sucesivamente, esto puede causar que el indicador de pH exhiba varias sombras de color o puede cambiar su color de amarillo a rojo con incubación prolongada. El medio de cultivo es ligeramente inhibitorio.
- Crecimiento en Agar TCBS: El medio es de color verde, la presencia de colonias sucrosa positivas (colonias amarillas) indica sospecha de *V. cholerae* principalmente, o de *V. alginolyticus* en algunos casos. Con la presencia de colonias verde azuladas (sucrosa negativa), se sospechará principalmente de *V. parahaemolyticus*.

APARIENCIA DE LAS COLONIAS CON RESPECTO A LOS MICROORGANISMOS:

Agar XLD

Colonias	Sospecha clínica
Amarillas, opacas	Coli, Aeromonas, Enterobacter, Serratia, Hafnia
Amarillas, mucosas	Klebsiella
Amarillas, opacas con centro negro	Citrobacter lactosa +
Rojas	Shiguela, Salmonella Paratyphi
Rojas o completamente negras con punto negro Naranja ligeramente opacas	Salmonella spp. Proteus, Citrobacter lactosa -
Naranja ligeramente opacas	Salmonella Typhi

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Agar SS

Colonias	Sospecha clínica
Colonias incoloras transparente	<i>Shigella</i> y <i>Salmonella</i> (mayoría)
Transparentes, con centro negro	<i>Proteus</i> y <i>Salmonella</i> (algunas)
Rosadas hasta rojas	<i>E. Coli</i>
Rosadas o de color cremoso, blanquecinas, opacas, mucosas	<i>Enterobacter, klebsiella</i>

Agar TCBS

Colonias	Sospecha clínica
Amarilla, planas, de 2 a 3 mm	<i>Vibrio cholerae, Vibrio alginolyticus</i>
Verdes, planas, de 2 a 3 mm	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Diminutas, transparente o amarillas	Enterobacterias y enterococos

Agar Mac Conkey Sorbitol

Colonias	Sospecha clínica
Incoloras, transparentes	<i>Escherichia coli O157</i>
Rojas, planas, de aspecto seco	<i>Escherichia coli</i>

E. Identificación

Identificación Bioquímica Convencional:

Las colonias sospechosas que crecen en las diferentes placas, se inoculan en medios de diferenciación bioquímica TSI, LIA, MIO, Agar Citrato de Simmons. (Véase en el Anexo 2)

Tabla de identificación para Coprocultivos

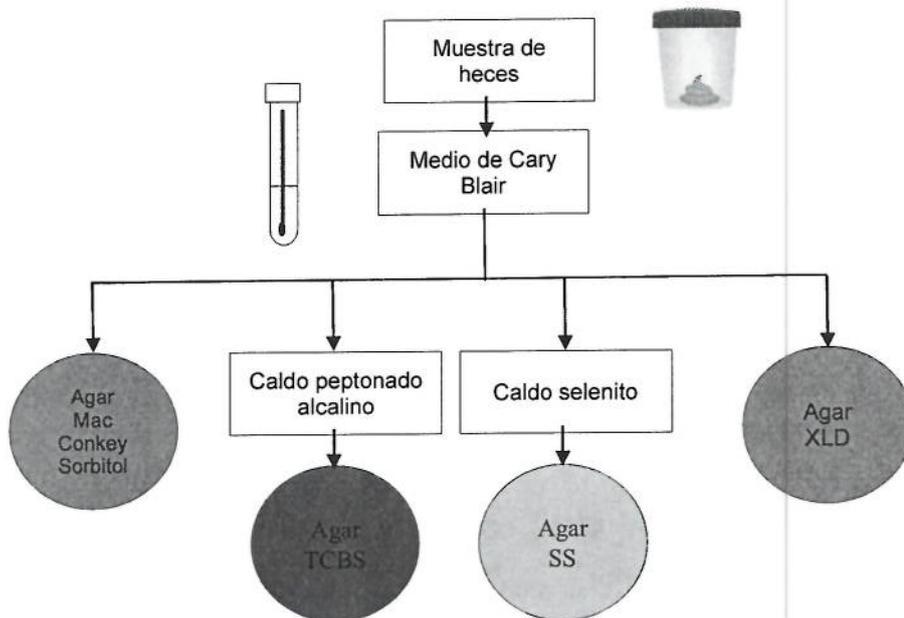
Microorganismo	KIA	LIA	SIM	CI T	M R	U	O X

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

	Lac/glu	GAS	H ₂ S		S	I	M				
<i>Salmonella typhi</i>	K/A	N*	P**	K/K	P**	N	P	N*	P	N	N
<i>S. paratyphi A</i>	K/A	P	N	K/A	N	N	P	N	P	N	N
<i>S. gallinarum</i>	K/A	N	P	K/K	P	N	N	N	P	N	N
<i>S. pullorum</i>	K/A	P	P	K/K	P	N	N	N	P	N	N
<i>Salmonella spp</i>	K/A	P	P	K/K	P	N	P	P-N	P	N	N
<i>Shigella sonnei</i>	K/A-A/A	N	N	K/A	N	N	N	N	P	N	N
<i>Shigella flexneri</i>	K/A	N-P	N	K/A	N	P-N	N	N	P	N	N
<i>Shigella dysenteriae</i>	K/A	N	N	K/A	N	N-P	N	N	P	N	N
<i>Shigella boydii</i>	K/A	N	N	K/A	N	N-P	N	N	P	N	N
<i>E. coli EPEC</i>	A/A	P-n	N	K/K	N	P	P	N	P	N	N
<i>E. coli EIEC</i>	A/A-K/A	P-N	N	K/A	N	P-N	N-p	N	P	N	N
<i>Yersinia enterocolitica</i>	K/A	N	N	K/A	N	P-N	N	N	P	P-N	N
<i>Vibrio cholerae</i>	K/A	N	N	K/K	N	P	P	P-N	P	N	P
<i>V. parahaemolyticus</i>	K/A	N	N	K/K	N	P	P	N-p	P-N	N-p	P
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	K/A a/a	P	N	K/K-K/A	N	P	P	P		N	P
<i>Aeromonas caviae</i>	A/A	N	N	K/A	N	P	P	P		N	P
<i>Aeromonas sobria</i>	K/A	P	N	K/K	N	P	P	N		N	P
<i>P. shigelloides</i>	K/A	N	N	K/K	N	P	P	N		N	P



Esquema de trabajo de Coprocultivo

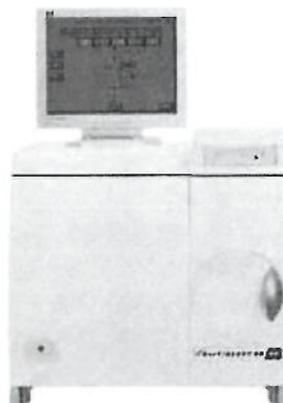


6.5. PROCEDIMIENTO: HEMOCULTIVO

La escasa cantidad de microorganismos presentes en la sangre durante un episodio de bacteriemia, que suele oscilar entre 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml y 10^4 UFC/ml pudiendo ser incluso inferior a 0,1 UFC/ml en un 20% de los casos. Esta característica hace que sólo las técnicas muy sensibles puedan ser utilizadas en el diagnóstico rápido de este proceso y que no sea posible utilizar el examen directo de la sangre mediante tinciones para el diagnóstico de la bacteriemia.

SISTEMA AUTOMATIZADO:

El Laboratorio de Microbiología del Hospital Vitarte utiliza el Sistema automático analizador Bact/ALERT, tecnología que mediante la incubación y agitación monitorea los frascos de hemocultivos para detectar el crecimiento microbiano.



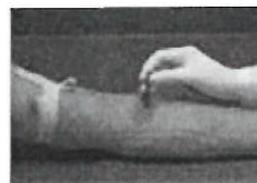
6.5.1 Fase pre analítica

• Materiales:

- Alcohol al 70%
- Yodo 1 – 2 %
- Algodón
- Guantes
- Aguja para extracción
- Sistema de extracción al vacío
- Paciente pediátrico: Botella amarilla (BacT/ALERT PF)
- Paciente adulto: Botella verde (BacT/ALERT FA)
- Jeringa con aguja
- Contenedor de residuos punzocortantes y residuos biológicos

A. Preparación de la piel:

La interpretación correcta de los hemocultivos es su contaminación con la microbiota cutánea durante la extracción. Para evitarla debe prepararse antes meticulosamente la piel de la zona de extracción.



- Después de localizar la vena, limpiar la zona de venopunción con alcohol al 70% durante un mínimo de 30 segundos.
- Aplicar una solución de yodo 1 – 2 % durante 30 segundos) en círculos concéntricos desde el punto de punción cubriendo un área circular de unos 5 cm de diámetro.
- Para pacientes alérgicos al yodo, limpiar con alcohol durante 60 segundos.
- Dejar que la zona se seque al aire antes de realizar la venipunción. No volver a palpar la vena.



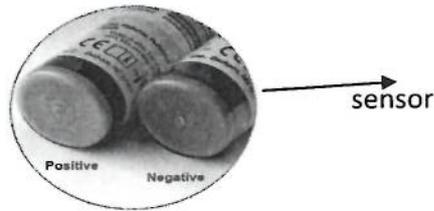
Con una técnica aséptica correcta, el número de hemocultivos contaminados no debe exceder del 3%. En general, se consideran microorganismos contaminantes *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp. y otros que forman parte de la microbiota de la piel.

B. Preparación de los frascos:

- Preparar el material necesario para la extracción de sangre:
 - Paciente pediátrico: Botella amarilla (BacT/ALERT PF)
 - Paciente adulto: Botella verde (BacT/ALERT FA)
- Revisar la superficie de los frascos, el medio y el sensor.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA



- A continuación comprobar que el medio esta transparente y el sensor está intacto y es de color azul verdoso. No utilizar el frasco si el sensor esta amarillo.
- Eliminar el precinto protector superior.

Nota: el tapón de caucho no está estéril y debe ser desinfectado.

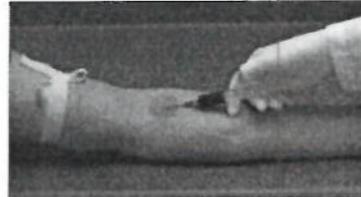
- Desinfectar el tapón de caucho con alcohol al 70% o una solución de yodo.
- Dejar secar 1 minuto antes de inocular.

C. Venopunción e inoculación del frasco:

- Para obtener la muestra e inocular los frascos, se puede usar uno de estos métodos:

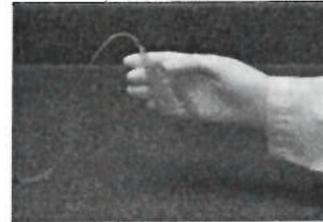
- **Aguja y jeringa:**

- Sin anticoagulante, extraer la cantidad apropiada.
- Inmediatamente inocular directamente al frasco para evitar la coagulación de la sangre en la jeringa, atravesándolos con la aguja en posición vertical.
- Usar las marcas de la jeringa como guía para introducir el volumen correcto.



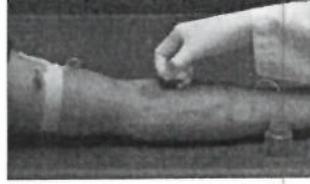
- **Extracción con sistema de extracción de hemocultivo Bact/ALERT:** Capuchón de extracción y adaptador interior para toma de muestras en tubo.

- Conectar el capuchón adaptador al conector luer del sistema de extracción de hemocultivos.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Realización de venopunción: cuando la aguja está colocada en la vena, asegurarla con un esparadrano o mantenerla en su posición.



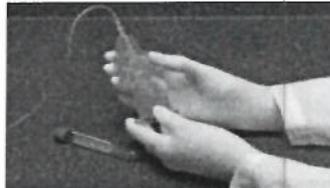
- Colocar el capuchón adaptador en el tapón de caucho del frasco de hemocultivo y presionar hacia abajo para introducirlo y obtener el flujo sanguíneo. Sujetar el capuchón adaptador en el frasco.



- Utilizando las líneas indicadoras de llenado de la etiqueta, obtener la cantidad de sangre requerida.



- Si se llegara a necesitar más sangre para realizar otras pruebas, colocar el adaptador interior en el capuchón y sujetarlo en su posición. Esto hace al capuchón compatible con cualquier tubo de extracción al vacío.



- Después de completar la extracción del hemocultivo, quitar el capuchón adaptador del frasco de hemocultivo y entonces retirar la aguja de la vena del paciente.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- No cubrir los códigos de barras de los frascos, llevar inmediatamente laboratorio.

D. Número e intervalo de extracciones:

El momento de la extracción de la sangre debería coincidir, en el caso de infección aguda, con aquel en el que existe un mayor número de bacterias viables en sangre, que se sabe que es el momento que precede a la aparición de la fiebre. Así se recomienda la extracción coincidiendo con la aparición de escalofríos (se cree que estos suelen preceder inmediatamente al pico febril y que aparecen aproximadamente al cabo de 1h de entrar el microorganismo en el torrente sanguíneo).

La probabilidad de recuperar el agente causal se incrementa en relación con el número de hemocultivos extraídos al paciente:

Es cercana al 60-80% en el primer hemocultivo,
80-90% cuando se cursan dos hemocultivos y
95-99% con el tercer hemocultivo.

En adultos, ante la sospecha de:

- sepsis aguda o cualquier infección: dos o tres hemocultivos
- endocarditis, infección de un dispositivo protésico o infección de catéter en la que puede ser difícil diferenciar entre contaminación y bacteriemia verdadera: tres o cuatro hemocultivos

En niños, en general se extrae un solo hemocultivo aerobio, y no se recomienda la extracción seriada de hemocultivos excepto en el paciente inmunodeprimido, pero para mejorar el diagnóstico algunos autores recomiendan dos extracciones si el niño pesa más de 1 kg y sólo una extracción si su peso es inferior.

No existe una recomendación universal sobre el intervalo de tiempo a respetar entre cada extracción y aunque por lo general se aconseja que estén separadas 10-30 minutos, este intervalo se puede acortar en situaciones de extrema urgencia e incluso en estos casos, para no retrasar el tratamiento antibiótico, pueden extraerse los hemocultivos simultáneamente de extremidades diferentes. En los casos en los que el foco de infección no está claro y los primeros hemocultivos son negativos, puede estar indicado repetir la extracción tras 24-48 horas.

Está recomendado extraer una nueva tanda de hemocultivos a las 48-72h de una bacteriemia ya diagnosticada a fin de conocer si persiste el aislamiento del mismo microorganismo a pesar de tratamiento antimicrobiano, lo que se conoce como bacteriemia complicada.

A. Volumen y dilución de la sangre

- Volumen:

Neonato y pediátrico: 1 – 4 mL



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

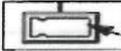
Adulto : 5 – 10 mL

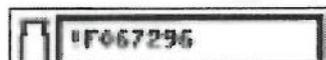
- De todas las variables que influyen en el aislamiento de una bacteria u hongo en un hemocultivo, el volumen de sangre cultivada es la más importante debido al bajo número de microorganismos presentes en la mayoría de las bacteriemias.
- Se considera que el índice de positividad aumenta entre el 3-5% por cada mililitro adicional de sangre cultivada. Sin embargo, la recomendación de elevar el volumen de sangre por extracción no se aplica, en cierta medida por la anemia que se puede provocar al paciente y para mantener la proporción de volumen sangre/medio de cultivo.
- En neonatos y niños, se ha preconizado que la mayor cantidad de bacterias presentes en sangre permite que con volúmenes considerablemente menores, incluso inferiores a 1 ml, se obtengan resultados aceptables y comparables a los de los adultos.
- Se recomienda cultivar un volumen de sangre aproximadamente del 4,5% del volumen total de sangre del paciente.
- La dilución de la sangre en el medio de cultivo es necesaria para neutralizar sus propiedades bactericidas. En los pacientes en tratamiento con antimicrobianos esta dilución permite, además, conseguir que la presencia de éstos se reduzca hasta alcanzar concentraciones sub-inhedorias.
- La dilución final recomendada es de 1/5 a 1/10 (volumen/volumen) ya que diluciones <1/5 reducen la positividad.

B. Incubación: Sistema automatizado: BacT/Alert:

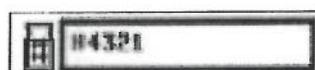
- Tras la obtención de la muestra se incuba el frasco de hemocultivo en el equipo automatizado BacT/Alert, a 35-37 °C hasta por 5 días.
- Los frascos aerobios serán incubados en el equipo BacT/Alert por un periodo de cinco días, si hay presencia de microorganismos en la muestra se generará dióxido de carbono a medida que los microorganismos metabolizan los sustratos del medio de cultivo. Cuando el crecimiento de los microorganismos genera CO₂, el color del sensor presente en el fondo de cada frasco de cultivo cambia de un color oscuro a un color más claro.
- El equipo lanzara una alerta ante la detección de un frasco positivo poniéndose la pantalla de color amarillo.

Ingreso de frasco al equipo:

1. Retirar la etiqueta del frasco
2. Presionar el botón  en la pantalla inicial
3. Colocar los datos en las líneas en blanco



Escanear el código de barras de la botella

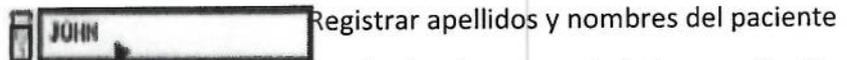


MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Consignar el número de muestra

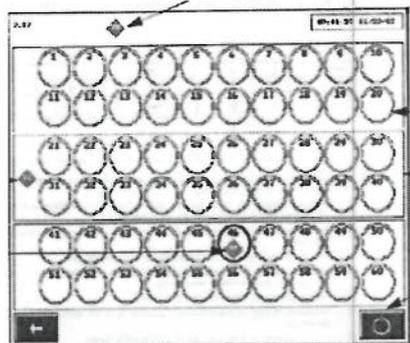


Historia clínica



Registrar apellidos y nombres del paciente

4. Colocar la botella en un cajón donde se prenda la luz que significa que las posiciones de las celdas están libres.



5. Cerrar la puerta

6. Presionar el check



6.5.2. Fase analítica

Procesamiento de los Hemocultivos positivos

Los hemocultivos positivos se deben procesar en cuanto el sistema comunique su positividad. Cuando se detecta un hemocultivo positivo se debe realizar lo antes posible una tinción Gram y un subcultivo en diferentes medios de a fin de hacer la identificación y el antibiograma de forma directa e inmediata para disminuir el tiempo de emisión de resultados.

A. Subcultivos de Hemocultivos positivos

Del frasco de hemocultivo positivo, con la ayuda de una jeringa de 1 mL (jeringa de tuberculina) se procederá a realizar el cultivo independientemente del resultado obtenido en la tinción de Gram, debe ser subcultivado en distintos medios (agar sangre de cordero, Mc Conkey, Manitol salado, Agar chocolate etc.) que se incubarán a 35-37°C en diferentes atmósferas y períodos de tiempo de 24 h, 48 o 72 h dependiendo del microorganismo

Teniendo en cuenta la morfología de los microorganismos observados en la tinción de Gram se deben realizar, además, subcultivos en medios específicos, por ejemplo, en agar Sabouraud si se observan levaduras, e incubar en caso de sospecha de hongos.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

B. Lectura de subcultivos

- Cuando se ha confirmado crecimiento bacteriano por subcultivo, se puede descartar el frasco de hemocultivo siguiendo los procedimientos de bioseguridad.
- En algunos casos el frasco de hemocultivo debe ser retenido para mayor estudio.
- En la interpretación de los resultados deben considerarse los datos clínicos individuales. Estafilococo coagulasa negativo, Corynebacterias y especies de *Bacillus* son contaminantes frecuentes y a menudo se aislan en sólo una de tres muestras.
- Si no hay leucocitos y el paciente no tiene factores de riesgo para bacteremia por estos gérmenes como inmunosupresión, prótesis, líneas de acceso vascular e historia de adicción a drogas intravenosas se puede concluir que la presencia de estos gérmenes se debe a contaminación.
- Se informará el resultado de cada frasco de hemocultivo individualmente.

6.6. PROCEDIMIENTO: CULTIVO DE SECRECIONES

6.6.1. MUESTRA DE DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES O CATETERES

A. Fase pre analítica

- Se aplica en la obtención de muestras para el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos intravasculares del torrente sanguíneo.
- La muestra llega al laboratorio de microbiología en un período NO MAYOR DE 15 MINUTOS a temperatura ambiente para prevenir que se seque.
- En el caso de no poder enviarse inmediatamente al laboratorio, la muestra debe mantenerse refrigerada a 4 °C hasta por 24 horas.

• Obtención de muestra de punta de catéter

- El personal médico del servicio de procedencia se encargará de la obtención de la muestra de la siguiente manera:
 - Realizar una buena limpieza y desinfección de la zona.
 - Realizar la extracción del catéter y cortar aproximadamente 5 cm de longitud de la punta del catéter.
 - Traspasar la muestra a un recipiente estéril con tapa hermética.
 - Rotular el recipiente con los datos del paciente.
 - Enviar inmediatamente la muestra al laboratorio.
- Una vez recepcionada la muestra, verificar que en la solicitud de análisis indique el cultivo de punta de catéter.
- Proceder a rotular de acuerdo al código asignado a la muestra.

B. Fase analítica

- **Procedimiento:** Técnica de Maki



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- La placa conteniendo el agar sangre de carnero debe encontrarse a temperatura ambiente.
- Flamear la pinza y dejar enfriar.
- Colocar el segmento del catéter sobre la superficie del agar sangre de cordero.
- Rodar la porción del catéter a través de la placa, cuatro veces mientras se ejerce presión hacia abajo con la pinza.
- Finalmente la punta de catéter se inocula en caldo BHI.
- Incubar la placa y el caldo a 35 – 37 °C por 24 horas.

• Lectura

- Observar presencia de turbidez en el caldo BHI, en ausencia de turbidez incubar hasta 48 h.
- Revisar la placa de agar sangre, si hay crecimiento se procede a:

Realizar el recuento de colonias

Positivo: Recuentos mayores de 15 UFC.

Negativo: Recuentos menores o iguales a 15 UFC.

6.6.2. MUESTRA DE HERIDA OPERATORIA

A. Fase pre analítica

Una muestra adecuada es aquella que se obtiene por aspiración con jeringa, es poco aconsejable el uso de hisopos ya que éstos pueden contaminarse con la microbiota de la piel.

En el caso de que la única manera de tomar la muestra sea por hisopado de la lesión, deberá tomarse de una zona representativa de la infección, en cantidad adecuada y evitando en lo posible como se mencionó, la contaminación con la microbiota normal.

• Materiales:

- Guantes de látex estériles.
- Solución salina estéril.
- Gasa estéril.
- Hisopos estériles de algodón.
- Medio de transporte de Stuart o Amies con carbón.
- Lámina portaobjeto.
- Tubo estéril (opcional), etc.

• Procedimiento:

- El procedimiento de la obtención de la muestra es realizado por el médico siguiendo las pautas:



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

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

B. Fase analítica

- Realizar los cultivos en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero Bunsen.
 - Utilizar las placas con los medios de cultivo cuando éstas hayan alcanzado la temperatura ambiente.
- Inoculación de la muestra:
- Muestra de aspirado purulento: Con una pipeta Pasteur inocular una gota de la muestra en un extremo de la superficie de la placa de agar de sangre de carnero, agar Mc Conkey, manitol salado y agar saboraud.
 - Hisopado de secreción: Frotar rotando el hisopo sobre la superficie del primer cuadrante de la placa tratando que toda su superficie haga contacto con el agar, luego, a partir de la descarga realizada con el hisopo, con el asa descartable realizar la siembra por agotamiento para obtener colonias aisladas. La inoculación en los medios se realiza empezando con el agar sangre, agar Mc Conkey, manitol salado y agar Saboraud.
- Incubar las placas a 35 – 37 °C por 24 – 48 horas en condiciones aeróbicas.
- Lectura:** A las 24 horas observar el crecimiento de colonias. Si no se observa crecimiento, seguir incubando hasta las 48 horas.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

6.6.3. MUESTRA DE TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR – SECRECIÓN FARINGEA

A. Pre analítica

Materiales:

- Bajalenguas estéril
- 02 Hisopos estériles
- 01 Lamina porta objetos estéril
- Tubo conteniendo caldo de cultivo
- Tubo conteniendo medio de transporte

Obtención de la muestra:

- Se instruye al paciente el procedimiento a realizar indicándole que respire profundamente, mantenga la boca bien abierta con la lengua afuera y diga “ah” lo que permitirá levantar la úvula y ayudará a reducir el reflejo de las arcadas.
- Con la ayuda de un bajalenguas, se presiona la lengua con suavidad.
- Frotar con un hisopo estéril la faringe posterior y el área amigdalara así como de cualquier zona inflamada o ulcerada. Es fundamental evitar rozar el hisopo con la mucosa oral, lengua, úvula ni dientes tanto antes como después de la toma de muestra, introducir este primer hisopo en un tubo conteniendo medio de transporte.
- Tomar otro hisopo estéril, repetir el procedimiento de toma de muestra y hacer un extendido en lámina de vidrio estéril para finalmente colocarlo en un tubo conteniendo caldo de cultivo, quebrar la parte excedente del mango de los hisopos.
- Terminado el procedimiento y si el paciente no tiene otras muestras pendientes indicar la fecha de entrega de resultados.

B. Fase analítica:

- Se debe inocular una placa de agar sangre de carnero al 5% con la torunda. Hay que asegurarse de rotar la torunda de modo que toda su superficie quede en contacto sobre el primer cuadrante de inoculación en la placa. A continuación se extiende la muestra con un asa estéril por los tres cuadrantes restantes de la placa, con el fin de obtener colonias bien aisladas. Finalmente se harán varias incisiones en el medio con la misma asa de siembra, para favorecer la visualización de la betahemólisis que sugiere la presencia de *S. pyogenes*.
- Adicionalmente se siembra en Agar Mac Conkey y agar Saboraud para la detección de ciertas enterobacterias y levaduras que pueden estar implicadas en cuadros de pacientes inmunodeprimidos.
- En caso de sospecha de infección por neisserias, los medios de cultivo utilizados para la siembra serán enriquecidos y selectivos: Thayer-Martin, de acuerdo a la disponibilidad de recursos se usará Agar Chocolate suplementado.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Incubación: Agar-sangre: incubar en estufa con 5-10% de CO₂ y 35°C durante 24-48 h. Agar mac Conkey y saboraud se incuban en aerobiosis, mac Conkey a 37° y agar saboraud a 30°C y 37°.

Existen también otros agentes etiológicos causantes de faringitis que en el Laboratorio de microbiología no se viene aislando como: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Chlamydomphila psittaci*, virus y bacterias anaerobias.

6.6.4. MUESTRA DE TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

A. Fase pre analítica

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

- Una vez obtenida la muestra, ésta deberá ser enviada a laboratorio en un frasco estéril de boca ancha.
- La muestra puede ser conservada hasta por dos horas a temperatura ambiente (15 a 30 minutos para volúmenes pequeños) ó 24 horas en refrigeración a 4 °C.

B. Fase analítica

B.1. Cultivo de aspirado transtraqueal

Materiales y equipos

- Estufa de 35 – 37 °C
- Mechero Bunsen o cabina de flujo laminar.
- Guantes de látex.
- Mascarilla.
- Contenedor de material contaminado.
- Agar sangre, Agar Mc Conkey, Manitol salado, etc

Procedimiento

- Seleccionar la porción de la muestra más purulenta o que contenga sangre.
- Con la ayuda de una pipeta estéril inocular 1mL del aspirado en un tubo con caldo Infusión Cerebro corazón (BHI).
- Utilizando un hisopo estéril o una pipeta Pasteur, inocular la muestra en un extremo de la superficie de las placas con los medios de cultivo: Agar sangre de cordero, Mc Conkey y Manitol saldo.
- Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa, con el propósito de obtener colonias aisladas.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Incubar el caldo y las placas con los medios de cultivo a 35 – 37 °C por 24 a 48 horas.
- Si no hay crecimiento a las 24 horas seguir incubando hasta por 48 horas.
- Realizar un frotis de la muestra sobre una lámina porta objetos cuidando que no sea muy grueso y realizar la coloración Gram

Lectura a las 24 horas: Si no hubiera crecimiento, incubar por 24 horas más.

B2. Cultivo de cepillado bronquial

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

Materiales y equipos

- Asa calibrada descartable de 0.01 ml o tip estéril (10 – 100ul) y micropipeta
- Estufa de 35 – 37 °C
- Mechero Bunsen o cabina de flujo laminar.
- Guantes de látex.
- Mascarilla.
- Contenedor de material contaminado.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero al 5%, Agar Mc Conkey y Manitol salado.

Procedimiento

- Homogeneizar en un vórtex.
- Tomar 0,01 ml de la muestra utilizando un asa calibrada o una micropipeta con tip estéril, sembrar en las placas con los medios de cultivo.
- Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- Incubar las placas con los medios a 35 – 37 °C por 24 – 48 horas.

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

Interpretación: Un recuento de más de 1000 UFC / ml de caldo o suero fisiológico (correspondientes a 10⁶ UFC / ml de la muestra original) puede correlacionarse con infección.

- Realizar un frotis de la muestra sobre una lámina porta objetos cuidando que no sea muy grueso y realizar la coloración Gram

B3. Cultivo de lavado bronco alveolar



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Durante el lavado bronco alveolar se puede coleccionar hasta 100 ml de fluido. Una porción de esta muestra es transportada al laboratorio.

Materiales y equipos

- Asa calibrada descartable de 0,01 ml o tip estéril (10 – 100 ul) y micropipeta.
- Estufa de 35 – 37 °C.
- Mechero Bunsen o cabina de flujo laminar.
- Guantes de látex
- Contenedor de material contaminado.
- Mascarilla.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero al 5%, Agar Mc Conkey y Manitol salado.

Procedimiento

- Tomar una alícuota de 0,01 ml con un asa calibrada o una micropipeta con tips estériles sembrar en los medios de cultivo.
- Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- Incubar las placas a 35 – 37 °C por 24 – 48 horas.

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

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

- Realizar un frotis de la muestra sobre una lámina porta objetos cuidando que no sea muy grueso y realizar la coloración Gram

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

6.6.5. MUESTRA DE SECRECIÓN VAGINAL

A. Fase pre analítica

- La toma de muestra tanto de pacientes adultas o pacientes pediátricas es realizada en el consultorio asignado por el médico tratante.
- Actualmente el laboratorio de microbiología no realiza aislamiento de: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* o *Ureaplasma*, *T. pallidum*, agentes virales y bacterias anaerobias.
- Cuando se sospeche de infección por *Neisseria gonorrhoeae* deberá enviarse muestra endocervical.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Materiales:

- 02 Hisopos estériles
- 01 Lamina porta objetos estéril
- Tubo conteniendo Medio de transporte
- Tubo conteniendo SSF
- En el caso de pacientes pediátricas se entregará además una lámina para test de Graham

Obtención de la muestra:

- Si la paciente proviene de consultorios externos: recepcionar la solicitud de análisis, verificar: que la paciente cumpla con las condiciones adecuadas y que en ese momento será atendida en el consultorio para la toma de muestra.
- Proceder a la entrega de materiales (de acuerdo a lo mencionado líneas arriba). Todos estos materiales serán entregados acompañados de su respectivo instructivo para el clínico.

B. Fase Analítica:

Examen directo en fresco:

SSF: Para examen en fresco, determinación del pH, test de Aminas con KOH 10%

Observación en fresco: Colocar una gota entre cubre y porta objeto, observar al microscopio con el objetivo de 10X y 40X e informar de forma semi cuantitativa:

- Presencia de *Trichomonas*
- Presencia de células epiteliales
- Presencia de células clave
- Presencia de leucocitos
- Presencia de formas levaduriformes o miceliales

Coloración Gram:

Observar con el objetivo de 100X e informar semicuantitativamente:

- Células Guía
- Presencia de gérmenes (morfología y tinción)

El Diagnóstico de Gonorrea se hace a partir de una muestra de endocervix, muchas veces en la muestra de flujo vaginal se pueden observar diplococos Gram negativos distribuidos intra y extra leucocitarios

Cultivo: Agar sangre y agar chocolate, incubar 37°C x 48 h con CO₂. Agar Mac Conkey y Saboraud se incuban en aerobiosis, Mac Conkey a 37° y agar Saboraud a 30°C y 37°.

6.6.6. MUESTRA DE SECRECIÓN ENDOMETRIAL

A. Fase pre analítica



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

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

Materiales:

- Medio de transporte
- Hisopo con punta de algodón.
- Tubo estéril con tapa rosca.

Obtención de la muestra

Mediante Hisopado:

- Obtener dos muestras de secreción endometrial, una para cultivo y la otra para un frotis directo y coloración Gram. Realizar este procedimiento inmediatamente después de obtener la muestra.
- El hisopo con la muestra obtenida para cultivo debe colocarse en el medio de transporte.
- Mantener a temperatura ambiente.
- Enviar la muestra al laboratorio antes de las 24 horas.

Mediante aspiración:

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

B. Fase analítica:

- **Cultivo:** Descargar la muestra con el hisopo sobre el primer cuadrante de la placa con agar sangre, luego con un asa descartable estéril realizar estrías a fin de obtener colonias aisladas. Realizar el mismo procedimiento en las placas con agar Mc Conkey Manitol salado se incuban en aerobiosis a 37°.
- Realizar un frotis de la muestra sobre una lámina porta objetos cuidando que no sea muy grueso y realizar la coloración Gram

6.6.7. MUESTRA DE SECRECIÓN OCULAR

- Actualmente el laboratorio de microbiología no realiza aislamiento de: *Chlamydias* y agentes virales
- Cuando el médico sospeche de infección por algún agente etiológico específico (por ejm: *Neisseria gonorrhoeae*, infección fúngica, etc) deberá de informarlo en la solicitud de análisis de laboratorio.
- Las muestras de párpados y conjuntiva, serán obtenidas por el personal de microbiología; las demás muestras como: raspado corneal, biopsia corneal, humor vítreo, muestras del aparato lagrimal, deberán ser tomadas por el médico especialista.

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

A. Fase pre analítica

- **Materiales:**

- 02 Hisopos estériles
- 01 Lamina porta objetos estéril
- Tubo conteniendo caldo de cultivo
- Tubo conteniendo medio de transporte

- **Obtención de la muestra:**

- **Secreción conjuntival:**

- Verificar que el paciente cumpla con las condiciones adecuadas dadas en los instructivos.
- Una vez realizada la verificación y la identificación del paciente rotular los materiales de acuerdo al código asignado a la muestra.
- Ubicar al paciente en una posición segura y cómoda.
- Colocar sobre la mesa de trabajo el material requerido para la toma de muestra.
- Se instruye al paciente el procedimiento a realizar
- Tomar una muestra por cada ojo con hisopos estériles separados, previamente humedecidos en caldo de cultivo.
- Rotar el hisopo en cada conjuntiva tarsal, introducir este hisopo en el tubo que contiene el medio de transporte (condicionada si la muestra no va a ser procesada inmediatamente)
- Tomar otro hisopo estéril, repetir el procedimiento de toma de muestra y hacer un extendido en lámina de vidrio estéril para finalmente colocarlo en un tubo conteniendo caldo de cultivo, quebrar la parte excedente del mango de los hisopos.
- Terminado el procedimiento y si el paciente no tiene otras muestras pendientes indicar la fecha de entrega de resultados.

- **Exudado palpebral:**

Para obtener este exudado se debe frotar el borde del párpado o de la zona ulcerada con un hisopo estéril previamente humedecida en caldo de cultivo y otro hisopado para extendido Gram en lamina y colocarlo dentro del tubo con medio de transporte.

B. Fase analítica

- **Materiales y equipos**

- Estufa de 35 – 37 °C
- Mechero Bunsen o cabina de flujo laminar.
- Guantes de látex.
- Mascarilla.
- Contenedor de material contaminado.
- Agar sangre de cordero al 5%, Agar Mc Conkey, Manitol salado, etc

- **Procedimiento**



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Utilizando el hisopo contenido en el medio de transporte, inocular la muestra en un extremo de la superficie de las placas con los medios de cultivo: Agar sangre de cordero 5%, Mc Conkey y Manitol saldo.
- Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa, con el propósito de obtener colonias aisladas
- Incubar el caldo y las placas con los medios de cultivo a 35 – 37 °C por 24 a 48 horas.
- Si no hay crecimiento a las 24 horas seguir incubando hasta por 48 horas.
- Realizar un frotis de la muestra sobre una lámina porta objetos cuidando que no sea muy grueso y realizar la coloración Gram
 - Si por indicación del médico se sospeche de *Neisseria gonorrhoeae* como agente causal se deberá cultivar e Agar Thayer Martin o Agar chocolate (considerando que no es un medio selectivo) e incubar de 35 – 37 °C en presencia de CO₂.
- **Lectura a las 24 horas:** Si no hubiera crecimiento, incubar por 24 horas más.

6.6.8. MUESTRAS DE ORIGEN INTRA ABDOMINAL

- Actualmente el laboratorio de microbiología no realiza aislamiento de anaerobios.
- Las obtenciones de las muestras se realizan por procedimientos invasivos que debe ser realizados por el médico especialista.

A. Fase pre analítica

Obtención de la muestra:

Líquido peritoneal:

- Se obtiene por aspiración percutánea (paracentesis) o mediante procedimientos quirúrgicos, bien por cirugía abierta o vía laparoscópica.
- La muestra deberá ser depositada en un frasco estéril sin preservantes.

Bilis:

- Las muestras se obtienen por aspiración percutánea con aguja y jeringa o mediante procedimientos quirúrgicos o endoscópicos.
- Se recomienda, si es posible, obtener un volumen de muestra de entre 1 y 5 mL e inocularla directamente en un frasco sin preservante.
- El volumen mínimo requerido es de 1 mL.

Exudados purulentos y abscesos:

- Se recogen por aspiración con aguja y jeringa mediante procedimientos quirúrgicos (laparotomía o laparoscopia) o por vía percutánea guiada por imagen.
- Si no se puede utilizar la aguja, se recoge directamente con jeringa o con catéter.
- Se desaconseja realizar la toma con hisopo este procedimiento sólo se empleará sino hay otra forma viable de obtener la muestra. Una vez efectuada la toma, el hisopo se introduce en un medio de transporte. Se recomienda



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

enviar dos hisopos, uno para cultivo y otro para la tinción de Gram.

Biopsias y tejidos:

- Se recogen mediante procedimientos quirúrgicos, percutáneos o endoscópicos.
- Las muestras se introducen en envases estériles sobre una gasa estéril humedecida en solución salina para evitar la desecación.

B. Fase analítica

• **Materiales y equipos**

- Estufa de 35 – 37 °C
- Mechero Bunsen o cabina de flujo laminar.
- Guantes de látex.
- Mascarilla.
- Contenedor de material contaminado.
- Agar sangre de cordero al 5%, Agar chocolate, Mc Conkey, Manitol salado, etc.

• **Procedimiento**

Líquidos y abscesos:

- Con una pipeta estéril se inoculará la muestra en un tubo que contiene caldo Tioglicolato o BHI.
- Con la misma pipeta se inoculará una a dos gotas directamente sobre las placas con medios de cultivo: agar sangre, agar chocolate y Mac Conkey, agar Sabouraud y si se dispone en agar manitol salado.
- Utilizando un asa estéril dispersar por agotamiento el inóculo a fin de obtener colonias aisladas.
- Realizar un frotis de la muestra sobre una lámina porta objetos y realizar la coloración Gram

Biopsias y tejidos:

- Las muestras de biopsias si son suficientemente grandes se pueden fraccionar con bisturí en una placa de Petri estéril o se pueden homogeneizar en un mortero estéril con una pequeña cantidad (0,5-1mL) de caldo tioglicolato, solución salina o caldo BHI antes de su siembra en los medios de cultivo.
- La siembra se realizará a partir del homogeneizado con un asa ó pipeta estéril inoculando 0,05 ml a cada placa de cultivo.
- Las muestras muy pequeñas que no puedan cortarse se pueden inocular directamente en el caldo de enriquecimiento (Tioglicolato o BHI).
- Realizar un frotis de la muestra sobre una lámina porta objetos y realizar la coloración Gram

• **Incubación:**



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Las placas de agar sangre se incuban a 35-37°C en aire o atmósfera con 5% de CO₂. Las placas de agar chocolate también a 35-37°C siempre con atmósfera de 5% de CO₂.
- Las placas de Mc Conkey y los caldos se incubarán a 35 - 37°C en atmósfera aeróbica.
- Los tubos con caldo de cultivo se examinarán cada día para ver si existe turbidez indicativa de crecimiento. Si el caldo de enriquecimiento está turbio, se realizará tinción de Gram y según los microorganismos que se observen, los subcultivos en los medios generales y selectivos adecuados.
- Cuando las muestras se han inoculado solo en caldos de enriquecimiento, es conveniente realizar al final del periodo de incubación, un subcultivo "de salida" en medios sólidos (agar chocolate y un medio no selectivo para anaerobios) aunque no se haya observado turbidez.
- El tiempo de incubación de las placas y los caldos de enriquecimiento será de al menos 5 días. Las placas con agar Sabouraud se incubará en aire a 30°C.

6.7. PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA

A. VALORES CRÍTICOS DEL ANTIBIOGRAMA

Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible, intermedio y resistente (S, I, R), para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes, las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos, la confrontación de los resultados *in vitro* y de los resultados clínicos.

B. INOCULACIÓN

Seleccionar cuatro a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, de un cultivo en placa.

Tocar la superficie de cada colonia con un asa de siembra y transferirlo a un tubo que contiene de 4 a 5 ml de SSF, ajustar la turbidez del inóculo hasta 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente usar una luz apropiada y mirar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

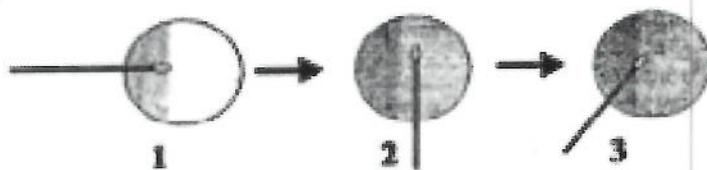
Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Inocular la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura 1). Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Figura 1.



C. APLICACIÓN DE LOS DISCOS.

Colocar los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Distribuir los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que toma contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

D. INCUBACIÓN

Incubar las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.

Después del tiempo recomendado de incubación (Anexo 2). Examinar cada placa y medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco. En los casos de *Staphylococcus spp.* Y *Enterococcus spp.* el tiempo de incubación debe prolongarse por 24 horas para una mejor detección de la resistencia a Oxacilina y Vancomicina, respectivamente.

E. LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo. En los medios suplementados con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa. Tener cuidado de no medir la zona de la hemólisis sino la de inhibición del crecimiento.

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Antibióticos y Diámetros Críticos para Enterobacterias

Patrones estándar del halo de inhibición, puntos de corte equivalente a la CMI para ENTEROBACTERIAS							
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco ug	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte	
			R	I	S	Equivalente a la CMI (µg/ml)	
						Resistente	Sensible
A	Ampicilina ^{a,c}	10	≤13	14-16	≥17	>32	<8
	Cefalotina ^{c,d}	30	≤14	15-17	≥18	>32	<8
	Cefazolina ^{c,d}	30	≤14	15-17	≥18	>32	<8
	Gentamicina ^c	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4
B	Amoxicilina/ácido clav	20/10	≤13	14-17	≥18	≥16/8	≤8/4
	Ampicilina/sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4
	Piperacilina/tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4
	Ticarcilina/ácido clav	75/10	<14	15-19	>20	>128/2	<16/2
	Mezlocilina	75	≤17	18-20	≥21	≥128	≤64
	Ticarcilina	75	≤14	15-19	≥20	≥128	≤16
	Piperacilina	100	<17	18-20	>21	>128	<16
	Cefamandol	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
	Cefonicid	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
	Cefuroxima (oral)	30	≤14	15-22	≥23	≥32	≤4
	Cefpodoxima	10	≤17	18-20	≥21	≥8	≤2
	Cefixima	5	<15	16-18	>19	>4	<1
	Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
	Cefotetan	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16
	Cefmetazol	30	<12	13-15	>16	>64	<16
	Cefoperazona ^a	75	<15	16-20	>21	>64	<16
	Cefotaxima ^{a,d}	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8
	Ceftizoxima ^a	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8
	Ceftriaxona ^{a,d}	30	<13	14-20	>21	>64	<8
	Cefepima	30	<14	15-17	>18	>32	<8
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4
	Meropenem	10	<13	14-15	>16	>16	<4
	Amikacina	30	<14	15-16	>17	>32	<16
	Ciprofloxacino ^{a,c}	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2
	Trimetoprim/sulfam ^{a,c}	1,25/23,75	<10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38
C	Ceftazidima ^e	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8
	Aztreonam ^e	30	<15	16-21	>22	>32	<8
	Kanamicina	30	<13	14-17	>18	>25	<6
	Netilmicina	30	<12	13-14	>15	>32	<12
	Tobramicina	10	<12	13-14	>15	>8	<4
	Tetraciclina ^c	30	<14	15-18	>19	>16	<4
	Cloranfenicol ^a	30	<12	13-17	>18	>32	<8
D	Carbenicilina	100	<19	20-22	>23	>64	<16
	Cinoxacino	100	≤14	15-18	≥19	≥64	≤16
	Lomefloxacino	10	≤18	19-21	≥22	≥8	≤2
	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	<4
	Ofloxacino	5	<12	13-15	>16	>8	<2
	Loracarbef ^f	30	<14	15-17	>18	>32	<8
	Nitrofurantoina	300	<14	15-16	>17	>128	<32
	Sulfisoxazol	250 o 300	<12	13-16	>17	>350	<100
	Trimetoprim	5	<10	11-15	>16	>16	<4
	Fosfomicina	200	<12	13-15	>16	>256	<64

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Antibióticos y Diámetros Críticos para *Staphylococcus aureus*

Patrones estándar del halo de inhibición para estafilococos, puntos de corte equivalentes a la CMI							
GRUPO	Antimicrobiano	Carga del disco ug	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Punto de corte Equivalente a la CMI (µg/ml)	
			R	I	S	Resistente	Sensible
A	Penicilina G ^{b,c}	10 U	≤28	--	≥29		≤0.1
	Oxacilina ^b (<i>S. aureus</i>) (SCN)	1	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2
B	Teicoplanina	30	<11	11-13	≥14	≥32	≤4
	Vancomicina ^d	30	--	--	≥15	>32	<8
	Eritromicina ^e	15	≤13	14-22	≥23	≥8	≤0.5
	Claritromicina ^e	15	≤13	14-17	≥18	≥8	≤2
	Azitromicina ^e	15	<13	14-17	>18	>8	<2
	Clindamicina ^e	2	<14	15-20	>21	>4	<0.5
	Trimetoprim / sulfam	1,25/23,75	<10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38
C	Gentamicina	10	<12	13-14	>15	>8	<4
	Ciprofloxacino	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1
	Ofloxacino	5	≤12	13-15	≥16	≥8	≤2
	Levofloxacino	5	<13	14-16	>17	>8	<2
	Cloranfenicol ^e	30	<12	13-17	>18	>32	<8
	Rifampicina ^{e,f}	5	<16	17-19	>20	>4	<1
	Tetraciclina ^{f,g}	30	<14	15-18	≥19	≥16	≤4
D	Norfloxacino	10	≤12	13-16	≥17	≥16	≤4
	Lomefloxacino	10	<18	19-21	>22	>8	<2
	Nitrofurantoina	300	<14	15-16	>17	>128	<32
	Sulfisoxazol	250 o 300	≤12	13-16	≥17	≥350	≤100
	Trimetoprim	5	<10	11-15	>16	≥16	≤4

Antibióticos y Diámetros Críticos para *Enterococcus spp.*

GRUPO	Antibiótico	Carga de disco	Diámetro de zona MM			Punto de corte MIC ug/ml		
			S	I	R	S	I	R
PENICILLINS								
A	Penicilin Ampicilin	10 units / 10 µg	≥16 / ≥17	--	≤14 / ≤16	≤8	--	≥16 / ≥16
GLYCOPEPTIDES								
B	Vancomycin	30 µg	≥17	15-18	≤14	≤4	8-16	≥32
Inv.	Teicoplanin	30 µg	≥14	11-13	≤10	≤8	16	≥32
LIPOGLYCOPEPTIDES								
C	Dalbavancin	--	--	--	--	≤0.25	--	--
C	Oritavancin	--	--	--	--	≤0.12	--	--
C	Telavancin	--	--	--	--	≤0.25	--	--
LIPOPEPTIDES								
B	Daptomycin	--	--	--	--	≤4	--	--
MACROLIDES								
O	Erythromycin	15 µg	≥23	14-22	≤13	≤0.5	1-4	≥8
FLUOROQUINOLONES								
U	Tetracycline	30 µg	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16
O	Doxycycline	30 µg	≥16	13-15	≤12	≤4	8	≥16
O	Minocycline	30 µg	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16
U	Ciprofloxacino	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4
O	Levofloxacino	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8
O	Gatifloxacino	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8
O	Norfloxacino	10 µg	≥17	13-16	≤12	≤4	8	≥16
NITROFURANTOINS								
U	Nitrofurantoin	300 µg	≥17	15-16	≤14	≤32	64	≥128
ANSAMYCINS								
O	Rifampin	5 µg	≥20	17-19	≤16	≤1	2	≥4
FOSFOYCINS								
U	Fosfomicin	200 µg	≥16	13-15	≤12	≤4	128	≥256
PHENICOLS								
O	Chloramphenicol	30 µg	≥18	13-17	≤12	≤8	16	≥32
STREPTOGRAMINS								
O	Quinupristin-dalfopristin	15 µg	≥19	16-18	≤15	≤1	2	≥4
OXAZOLIDINONES								
B	Linezolid	30 µg	≥23	21-22	≤20	≤2	4	≥8
B	Tedizolid	--	--	--	--	≤0.5	--	--

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Antibióticos y diámetros críticos para *Pseudomona aeruginosa*

GRUPO	Antibiótico	Carga de disco	Diámetro de zona MM			Punto de corte MIC ug/ml		
			S	I	R	S	I	R
PENICILLINS								
O	Piperacillin	100 µg	≥21	15-20	≤14	≤16	32-64	≥128
β-LACTAM COMBINATION AGENTS								
A	Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	15-20	≤14	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
B	Ceftazidime-avibactam	30/20 µg	≥21	-	≤20	≤8/4	-	≥16/4
B	Ceftolozane-tazobactam	30/10 µg	≥21	17-20	≤16	≤4/4	8/4	≥16/4
O	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥24	16-23	≤15	≤16/2	32/2-64/2	≥128/2
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)								
A	Ceftazidime	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
B	Cefepime	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
MONOBACTAMS								
B	Aztreonam	30 µg	≥22	16-21	≤15	≤8	16	≥32
CARBAPENEMS								
B	Doripenem	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8
B	Imipenem	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8
B	Meropenem	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8
O	Colistin	-	-	-	-	≤2	-	≥4
O	Polymyxin B	-	-	-	-	≤2	4	≥8
AMINOGLYCOSIDES								
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
B	Amikacin	30 µg	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64
O	Netilmicin	30 µg	≥15	13-14	≤12	≤8	16	≥32
FLUOROQUINOLONES								
B	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8
O	Norfloxacin	10 µg	≥17	13-16	≤12	≤4	8	≥16
O	Lomefloxacin	10 µg	≥22	19-21	≤18	≤2	4	≥8
O	Ofloxacin	5 µg	≥16	13-15	≤12	≤2	4	≥8
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Antibióticos y diámetros críticos para *Acinetobacter spp.*

GRUPO	Antibiótico	Carga de disco	Diámetro de zona MM			Punto de corte MIC ug/ml		
			S	I	R	S	I	R
PENICILLINS								
O	Piperacilin	100 µg	≥21	18-20	≤17	≤16	32-64	≥128
β-LACTAM COMBINATION AGENTS								
A	Ampicillin-sulbactam	10/10 µg	≥15	12-14	≤11	≤8/4	16/8	≥32/16
B	Piperacilin-tazobactam	100/10 µg	≥21	18-20	≤17	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4
O	Ticarcillin-clavulanate	75/10 µg	≥20	15-19	≤14	≤16/2	32/2-64/2	≥128/2
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)								
A	Ceftazidime	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
B	Cefepime	30 µg	≥18	15-17	≤14	≤8	16	≥32
B	Cefotaxime	30 µg	≥23	15-22	≤14	≤8	16-32	≥64
B	Ceftioxone	30 µg	≥21	14-20	≤13	≤8	16-32	≥64
CARBAPENEMS								
A	Doripenem	10 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8
A	Imipenem	10 µg	≥22	19-21	≤18	≤2	4	≥8
A	Meropenem	10 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8
LIPOPEPTIDES								
O	Colistin		-	-	-	≤2	-	≥4
O	Polymyxin B	-	-	-	-	≤2	-	≥4
AMINOGLYCOSIDES								
A	Gentamicin	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
A	Tobramycin	10 µg	≥15	13-14	≤12	≤4	8	≥16
B	Amikacin	30 µg	≥17	15-16	≤14	≤16	32	≥64
O	Netilmicin	-	-	-	-	≤8	16	≥32
TETRACYCLINES								
(8) Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline and minocycline. However, tetracycline may be susceptible to doxycycline, minocycline, or both.								
B	Doxycycline	30 µg	≥13	10-12	≤9	≤4	8	≥16
B	Minocycline	30 µg	≥16	13-15	≤12	≤4	8	≥16
U	Tetracycline	30 µg	≥15	12-14	≤11	≤4	8	≥16
FLUOROQUINOLONES								
A	Ciprofloxacin	5 µg	≥21	16-20	≤15	≤1	2	≥4
A	Levofloxacin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8
O	Gatifloxacin	5 µg	≥18	15-17	≤14	≤2	4	≥8
FOLATE PATHWAY ANTAGONISTS								
B	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10	≤2/38	-	≥4/76

Antibióticos y diámetros críticos para *Stenotrophomonas maltophilia*

GRUPO	Antibiótico	Carga de disco	Diámetro de zona MM			Punto de corte MIC ug/mL		
			S	I	R	S	I	R
β-LACTAM COMBINATION AGENTS								
O	Ticarcillin-clavulanate	-	-	-	-	≤16/2	32/2-64/2	≥128/2
CEPHEMS (PARENTERAL) (Including cephalosporins I, II, III, and IV. Please refer to Glossary I.)								
B	Ceftazidime	-	-	-	-	≤8	16	≥32
TETRACYCLINES								
B	Minocycline	30 µg	≥19	15-18	≤14	≤4	8	≥16
FLUOROQUINOLONES								
B	Levofloxacin	5 µg	≥17	14-16	≤13	≤2	4	≥8
FOLATE PATHWAY ANTAGONISTS								
A	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75 µg	≥16	11-15	≤10	≤2/38	-	≥4/76
PHENICOLS								
C	Chloramphenicol	-	-	-	-	≤8	16	≥32

F. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS ACTUALMENTE DISPONIBLES EN EL PERÚ

1. BETALACTÁMICOS:

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Penicilinas:

Penicilinas naturales:

- Penicilina G
- Penicilina V

Penicilinas antiestafilocócicas:

- Oxacilina
- Cloxacilina
- Dicloxacilina

Aminopenicilinas:

- Ampicilina
- Amoxicilina

Penicilinas asociadas a inhibidores de betalactamasas:

- Ampicilina/Sulbactam
- Amoxicilina/Ácido Clavulánico
- Amoxicilina/Sulbactam

Cefalosporinas:

Cefalosporinas de primera generación:

- Cefalotina
- Cefazolina
- Cefadroxilo
- Cefradina
- Cefalexina

Cefalosporinas de segunda generación:

- Cefaclor
- Cefuroxima
- Loracarbef

Cefalosporinas de tercera generación:

- Cefotaxima
- Cefixima
- Ceftriaxona
- Ceftazidima
- Cefpodoxima

Cefalosporinas de cuarta generación:

- Cefpirome



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Cefepime

Cefalosporinas asociadas a inhibidores de betalactamasas:

- Cefoperazona/Sulbactam

Monobactams:

- Aztreonam

Carbapenems:

- Imipenem
- Meropenem

2. AMINOGLUCÓSIDOS:

- Gentamicina
- Tobramicina
- Kanamicina
- Amikacina
- Neomicina
- Netilmicina
- Espectinomicina (AMINOCICLITOL)

3. QUINOLONAS:

- Ácido Nalidíxico
- Ácido Pipemídico
- Enoxacina

4. FLUOROQUINOLONAS:

- Norfloxacin
- Ofloxacin
- Pefloxacin
- Ciprofloxacina
- Levofloxacin
- Esparfloxacin
- Moxifloxacin

5. MACRÓLIDOS:

- Eritromicina
- Roxitromicina
- Claritromicina
- Azitromicina

6. LINCOSAMIDAS:



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Lincomicina
- Clindamicina

7. OXAZOLIDINONAS:

- Linezolide

8. GLICOPÉPTIDOS:

- Vancomicina
- Teicoplanina

9. TETRACICLINAS:

- Oxitetraciclina
- Clortetraciclina
- Doxiciclina
- Minociclina

10. SULFONAMIDAS:

- Sulfisoxazol (en asociación)
- Sulfametoxazol (en asociación)
- Sulfametizol (en asociación)
- Sulfacetamida
- Sulfadiazina
- Sulfatiazol

11. OTROS:

- Cloramfenicol
- Rifampicina
- Metronidazol
- Fosfomicina – Trometamol
- Cotrimoxazol

6.8. PROCEDIMIENTO TECNICO PARA MAPEO MICROBIOLÓGICO

El medio ambiente hospitalario contiene numerosos microorganismos pero sólo en algunos casos se ha demostrado claramente una relación causa-efecto entre la presencia de microorganismos en este medio y el desarrollo de infección en humanos.

Los patógenos para los que existe mayor evidencia de su capacidad de sobrevivir en reservorios ambientales son enterococo, incluyendo los resistentes a la Vancomicina, y *Staphylococcus aureus*, incluyendo los resistentes a la Meticilina.

Algunos organismos internacionales con autoridad en el campo del control de la



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

infección relacionada con la asistencia sanitaria como los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), no suelen recomendar la realización de este tipo de cultivos y los reservan para situaciones especiales en las que pueda haber indicios de que algún objeto o material ambiental tenga relación con una infección nosocomial.

Los cultivos ambientales deben estar orientados a la vigilancia y control de la infección nosocomial. Se incluyen en este documento cultivos de vigilancia de unidades críticas y por otro los cultivos ambientales de control relacionados con el estudio de brotes de infección nosocomial.

Servicio de Apoyo al Diagnóstico - Área de Laboratorio, Microbiología determinara la presencia y ausencia de microorganismos patógenos provenientes de las diferentes áreas.

6.8.1 CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AIRE: QUIRÓFANOS Y OTRAS UNIDADES

Estas infecciones se adquieren por vía inhalatoria si en el aire que respiran hay microorganismos patógenos; Los cultivos sistemáticos de aire deben realizarse exclusivamente en unidades con sistemas de ventilación con filtro HEPA terminal en el aire de entrada, en los que no hay entrada de aire exterior, y en los que haya pacientes en riesgo, es decir en las unidades quirúrgicas.

A. Recogida de la muestra

Cuando se quiere descartar que la fuente de contaminación del aire del quirófano sean los aparatos con ventilador que están funcionando dentro del área se puede realizar una toma de muestra del propio ventilador mediante una torunda impregnada en medio de cultivo líquido. Además de los cultivos de aire para hongos se pueden realizar cultivos de aerobios para comprobación del buen funcionamiento del sistema de ventilación.

B. Frecuencia del muestreo

- En los quirófanos de cirugía se recomienda una toma mensual.
- En las demás áreas se recomienda una menor frecuencia cada 3 o 6 meses
- Antes de poner en marcha la instalación
- Cuando haya obras en la proximidad
- Cuando se haya encontrado algún caso de infección con sospecha de tener su origen en el quirófano /unidad o cuando en los controles rutinarios se haya encontrado la presencia de contaminación.
- La realización de cultivos para recuento de aerobios sólo se debe realizar antes de poner en marcha una nueva instalación de quirófano o unidad o en alguna situación especial de brote.

C. Transporte y conservación de la muestra

La placa con medio de cultivo debe retirarse del mismo, teniendo cuidado de no contaminarla y se enviarán a Microbiología bien identificadas indicando el área donde se ha realizado la toma de muestra.

D. Procesamiento de la muestra



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Las muestras se incubarán en estufa convencional; se realizarán lecturas diarias de las placas para detectar crecimiento lo antes posible.

Se tendrá cuidado al mover las placas que tengan crecimiento para evitar siembras secundarias y no alterar el recuento de colonias.

Recuento de aerobios: en cada lectura se realizará el recuento de colonias sin identificación de los microorganismos.

E. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

Recuento de aerobios: se utilizará una placa de agar sangre que se incubará a 35°C durante 48 horas en estufa convencional.

F. Criterios para la interpretación de los resultados

Recuento de aerobios: los valores de bioseguridad admisibles dependen también del tipo de quirófano (se indican en unidades formadoras de colonias (UFC) por m³):

- Ambiente muy limpio <10 UFC/m³
- Ambiente limpio <10-100 UFC/m³
- Ambiente aceptable 100-200 UFC/m³

G. Información de los resultados

Esta información precoz permitirá tomar decisiones rápidas sobre la actividad quirúrgica y diagnóstico del estado del área en cuanto a sistema de ventilación, limpieza, etc.

Recuento de aerobios: se realizará un único informe a las 48 horas indicando el número de UFC.

En los informes debe figurar la información de qué área se trata y si la muestra se tomó con el área vacía o durante actividad.

6.8.2 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE AREAS, OTRAS UNIDADES y COLONIZACIÓN DE LAS MANOS

Los microorganismos tienen una determinada supervivencia en el ambiente y cuando una superficie se contamina por un microorganismo este puede sobrevivir allí días, semanas e incluso meses. Prácticamente cualquier superficie o medio hospitalario pueden estar colonizados por microorganismos potencialmente patógenos; ello hace que se puedan transmitir de manera cruzada, generalmente a través de las manos del personal sanitario, a otras superficies tanto animadas como inanimadas.

Las manos del personal sanitario pueden estar colonizadas por microbiota residente o por microbiota transitoria. La microbiota residente estará constituida por microorganismos comensales de la piel como *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. O *Propionibacterium* spp. La microbiota transitoria por el contrario, se adquirirá por el contacto de las manos con pacientes o superficies contaminadas.

Mientras que la primera, rara vez se relaciona con infecciones, la microbiota



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

transitoria es la causante de la mayoría de los brotes infecciosos hospitalarios.

La recogida de muestras de las manos es la impresión de las manos o dedos en agar o a través de hisopos. El hisopo es adecuado para investigar pequeñas zonas de la mano como uñas o pulpejos.

A. Recogida de la muestra

Superficies inanimadas o sólidas:

- son las que más están en contacto con las manos del personal sanitario como: interruptores de la luz, teclados y ratón de ordenador, teléfonos, mandos de grifería, ropas del personal, etc.
- Se recomienda la toma de muestra con un hisopo estéril humedecido con medio BHI (*Brain Heart Infusion*).
- Tras humedecerlo se retira el exceso de líquido presionándolo varias veces contra los bordes internos del tubo del medio BHI.
- Una vez hecho esto, se introduce el hisopo en la superficie a estudiar por ejemplo, entre las teclas de un ordenador o en el interior de una boca de grifo, etc y se rota varias veces
- A continuación, se corta la cabeza del hisopo con tijeras estériles para que caiga dentro del tubo.
- Se recomienda la recogida de un mínimo de 15 placas por habitación estudiada.
- Una vez tomada la muestra, se cierran las placas, se identifica detalladamente la zona estudiada y se sellan con papel film

Es conveniente desinfectar la superficie donde se ha colocado la placa ya que suelen quedar restos de agar que pueden favorecer el sobre crecimiento de microorganismos en esa zona.

Superficies animadas o del personal sanitario:

- básicamente nos restringiremos a las fosas nasales y las manos del personal sanitario ya que son reservorio y vehículo de transmisión.
- Se centrarán sobre todo en las manos y para ello se emplean básicamente diferentes métodos:
 - Método 1
 - ✓ El primero es el de inmersión de las manos en bolsas estériles de polietileno. Estas bolsas deben contener aproximadamente 50 ml de caldo BHI
 - ✓ Se introducen las manos en dichas bolsas durante 1 minuto
 - ✓ Pasado este tiempo, se retiran las manos y se cierra la bolsa herméticamente.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- ✓ Es recomendable lavarse las manos con agua y jabón para evitar el sobre crecimiento bacteriano impulsado por la presencia del caldo nutritivo.
- Método 2
 - ✓ Consiste en la impresión de los dedos de la persona a estudiar en placas de agar.
 - ✓ La elección del medio de cultivo depende del tipo de microorganismo que se quiera investigar y de las preferencias del investigador.
 - ✓ Se presionarán las placas levemente con cada yema de los dedos realizando posteriormente un movimiento de vaivén hacia delante a medida que se presiona hasta producir un pequeño corte en el agar con las uñas, ya que suelen ser estas, zonas altamente contaminadas.
 - ✓ Se cerrará e identificará cada placa sellándolas finalmente
 - ✓ Si se sospecha que el brote pudiera estar originado por microorganismos cuyo reservorio se encuentra habitualmente en las fosas nasales, deben tomarse muestras de esa localización al personal sanitario. Para ello, se introducirá un hisopo en la parte anterior de cada orificio nasal y se rotará varias veces.

B. Transporte y conservación de la muestra

Generalmente, los microorganismos que se investigan en los brotes, son patógenos que sobreviven bajo condiciones de escasa demanda nutricional y acostumbrados a la temperatura hospitalaria; por lo tanto no son necesarias condiciones especiales de transporte y conservación a excepción de las muestras de fosas nasales.

En estas muestras de fosas nasales se empleará un hisopo con medio de transporte y se podrán conservar a temperatura ambiente durante un tiempo de hasta 24 horas o en nevera entre 2º y 8ºC si se demorase la siembra.

C. Procesamiento de la muestra

- Las muestras recogidas con hisopo serán procesadas de manera que los caldos con medio BHI se agitarán en vórtex durante 30 segundos.
- A continuación, El caldo se sembrará en placas a la llegada al laboratorio.
- Se inocularán aproximadamente 0,5 ml. del caldo BHI de las mismas en las placas de cultivo.
- Las placas se deben mover con un movimiento rotatorio para distribuir el líquido y después se secan
- Las placas se incuban de forma invertida

D. Selección de medios de cultivo y condiciones de incubación

- Se recomiendan las placas con agar nutritivo no selectivo tipo TSA.
- Los medios en los que hay que sembrar el caldo BHI dependerán del microorganismo que se esté tratando de recuperar, por ejemplo, para



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

recuperar bacilos gran negativos se sembrará en agar McConckey, cocos gran positivos en agar sangre o manitol salado y hongos en medio Sabouraud.

- Las placas de cultivo y los caldos nutritivos se incubarán durante 24 horas a 37°C en aerobiosis; durante 24 horas tras lo cual se hará una primera lectura, si no hay crecimiento se re incubarán otras 24 horas y se realizará la lectura final.

E. **Información de los resultados:** Será conveniente la elaboración de informes que ayuden en la toma de medidas cautelares por parte del equipo encargado del control; inicialmente, se informará de la presencia o ausencia de una determinada muestra ambiental microorganismo en cuestión. (Anexo 4)

6.9. PROCEDIMIENTO: HONGOS, ACAROS Y DEMODEX

6.9.1. Fase pre analítica: Indicaciones para toma de muestra

- El día del examen, no lavar la zona afectada.
- No aplicar ningún tipo de loción, talco, crema o esmalte de uñas en la zona afectada.
- No recortarse las uñas.
- No aplicar ningún tipo de maquillaje si la lesión es en la cara o en los ojos.
- Tener en cuenta para el caso de Examen directo y para el Cultivo de Hongos lo siguiente:
 - a. Si tiene tratamiento vía oral realizar el examen después de 30 días de terminado el medicamento.
 - b. Si tiene tratamiento tópico (cremas, loción, esmalte) realizarse el examen después de 15 días.

6.9.2. Fase analítica:

A. Investigación de demódex

- Limpiar el área de trabajo con lejía o algún otro desinfectante y ordenar los materiales a utilizar.
- Verificar la zona de investigación, así como las anotaciones de los tomadores de muestra sobre síntomas, signos, tratamiento anterior, tiempo de lesión, y factores de riesgo del paciente.
- Enumerar las muestras en el cuaderno de trabajo
- Observar al microscopio con objetivo de 10X y luego con objetivo de 40X las láminas portaobjetos para identificar al *Demodex folliculorum* con KOH 20%
- Reportar el resultado en el cuaderno de Directos.
- Si se observa la presencia del ácaro se reporta como:

Se observa *Démoxex folliculorum*, indicando el número observado de ácaros en cada ojo y el número de pestañas obtenidas de cada ojo.
- Si no se observa la presencia de ácaros se reporta como:



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

No se observa *Démox* *folliculorum*, indicando el número de pestañas obtenidas de cada ojo.

B. Investigación de hongos

- Limpiar el área de trabajo con lejía o desinfectante.
- Verificar la zona de investigación y las anotaciones sobre tratamiento anterior, tiempo de lesión, factores de riesgo.
- Si la zona es piel, pelo o uñas:
 - a. verificar que contengan suficiente muestra para realizar el examen directo y cultivo respectivos.
 - b. Si no hay suficiente muestra para realizar las pruebas se hace la anotación de Muestra escasa.
- 2. Rotular en el Cuaderno de Cuaderno de trabajo
- 3. Enumerar las muestras que son procesadas durante todo el día.
- 4. Las muestras de piel, pelo o uñas :
 - a. Se realiza un raspado de la zona lesionada a fin de obtener células epiteliales, en el caso uñas se toma la muestra del lecho ungueal, y cabellos mediante raspado de la zona y obtención de cabellos desde el folículo piloso, a estas muestras se realiza un examen directo con KOH al 40 %, dejar actuar por 15 a 20 minutos.
 - b. Observar al microscopio con objetivo de 10X y luego de 40X para observar la presencia de levaduras, pseudohifas.
- 5. Descartar las láminas en contenedores de desechos biológicos y las placas en bolsa roja.
- 6. Si no se observan estructuras micóticas se reporta como: "No se observan estructuras micóticas".
- 7. Reportar la presencia de levaduras, pseudohifas en el Cuaderno de trabajo.

C. Investigación de ácaros

1. Limpiar el área de trabajo con lejía o desinfectante.
2. Verificar la zona de investigación sobre tratamiento anterior, tiempo de lesión, factores de riesgo.
3. Verificar las láminas y cintas adhesivas y las anotaciones de los tomadores de muestra.
4. Rotular en el Cuaderno de trabajo
5. Enumerar las muestras que son procesadas durante todo el día.
6. Observar al microscopio con objetivo de 10X y luego de 40X para observar al *Sarcoptes scabiei*.
7. Descartar las láminas en contenedores de desechos biológicos.
8. Reportar la presencia de *Sarcoptes scabiei* en el Cuaderno de trabajo



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

9. Si se observa al acaro se reporta como:
 - a. Se observa *Sarcoptes scabiei*.
10. Si no se observa la presencia del ácaro se reporta como
 - a. No se observa *Sarcoptes scabiei*.
11. Desinfectar el área de trabajo.

D. CULTIVO DE HONGOS

1. Desinfectar el área de trabajo
2. Verificar la zona de investigación y las anotaciones de los tomadores de muestra sobre tratamiento anterior, tiempo de lesión, factores de riesgo.
3. Rotular e ingresar al cuaderno de trabajo
4. Enumerar las muestras que son procesadas durante todo el día con el código interno
5. Si la muestra es piel, pelo o uñas:
 - a. verificar que las placas contengan suficiente muestra para realizar el examen directo y cultivo respectivos.
 - b. Si no hay suficiente muestra para realizar las pruebas se hace la anotación de escasa muestra.
6. Realizar el cultivo de las muestras en los medios Sabouraud utilizando el asa descartable para inocular la muestra sobre la superficie de los medios.
7. Incubar los medios a temperatura ambiente durante 20 días.
8. Realizar el examen directo con KOH al 20 %, dejar actuar por 15 a 20 minutos.
9. Observar al microscopio con objetivo de 10X y luego de 40X para observar la presencia de levaduras, pseudohifas.
10. Reportar la presencia de estructuras micóticas así como la cantidad observada por cruces en el cuaderno de trabajo
11. Si la muestra a procesar es heces, esputo u otro líquido biológico se procede:
 - a. realizar un extendido de la muestra para realizar la coloración Gram
 - b. Realizar el cultivo de la muestra en los medios Sabouraud con el asa descartable sobre la superficie de los medios e incubar a 37 o C por 7 días.
 - c. Observar las láminas con aceite de inmersión a 100X y reportar la presencia de levaduras o hifas en el cuaderno de trabajo
12. Descartar las láminas en contenedores de desechos biológicos y las placas en bolsa roja.
13. Si la muestra fuera piel, pelo o uña y no se observan estructuras micóticas en el examen directo:



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- a. se deja la lámina con KOH en cámara húmeda para ser leída al día siguiente.
14. Realizar la lectura visual de los medios diariamente o interdiario :
 - a. realizando el reporte diario en el cuaderno de cultivo de hongos.
 - b. Si se observa el crecimiento de levaduras se realiza la prueba del tubo germinativo
 - c. anotando los subcultivos a realizar en el cuaderno de trabajo
 - d. Si se observa crecimiento de colonias sospechosas de algún hongo filamentosos se registra en el cuaderno de trabajo

E. Prueba del tubo germinativo:

- Tocar apenas la colonia con un asa descartable y emulsionar en 0.5 ml de suero humano e incubar por 2 horas a 37°C.
- Leer a las dos horas con un objetivo de 40X.
- Se considera positivo la prueba:
 - a. si observa más de 5 levaduras con desarrollo de tubo germinativo por campo de 40X.
- Realizar la identificación de las levaduras y hongos filamentosos en base los subcultivos realizados.
- Reportar la identificación de los hongos en el cuaderno de cultivo de hongos.
- Ingresar los resultados al cuaderno de trabajo al cabo de los 20 días en el caso de muestra de piel, pelos y uñas y a los 7 días para el caso de otros fluidos corporales.

6.10. DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS POR BACILOCOPIA

• Aspectos generales:

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente los pulmones (TB pulmonar) pero puede también invadir cualquier otro sitio del cuerpo (TB extrapulmonar)

• Síntomas:

- El síntoma más común de la TB pulmonar es la tos productiva por más de dos semanas
- Otros síntomas respiratorios pueden incluir dificultad para respirar, dolor de pecho y hemoptisis (tos o expectoración con sangre)



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Las personas con TB pueden también experimentar pérdida del apetito, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna y fatiga.
- Los síntomas pueden variar dependiendo de la edad de la persona, si es paciente con VIH y por el sitio de la enfermedad (pulmonar o extrapulmonar)

• TUBERCULOSIS MULTIDROGO RESISTENTE:

TB Resistente a rifampicina (TB RR) es la TB con resistencia a rifampicina con o sin resistencia a otras drogas (nueva definición), detectada usando métodos fenotípicos o genotípicos

TB multidrogoresistente (TB MDR) es la TB con resistencia al menos isoniazida y rifampicina

TB extensivamente drogoresistente (TB XDR) es la TB MDR con resistencia además a fluoroquinolonas y al menos una de las tres drogas inyectables de segunda línea

6.10.1 Muestra de esputo:

A. El envase:

El frasco para la colecta de la muestra debe:

- tener una capacidad para 30 - 50 ml
- Material claro o transparente
- Los lados y paredes deben permitir el etiquetado
- De un solo uso y de material combustible
- A prueba de fugas y tapa de rosca
- Boca ancha



B. Momento de la obtención de la muestra:

- Primera toma : en el hospital – durante la visita inicial
- Primera de la mañana: En casa – primer esputo producido en la mañana del segundo día de visita a la clínica (idealmente, el día posterior a la visita inicial)

C. Educación del paciente e instrucciones:

La mejor muestra es la que viene de los pulmones.

Los pasos para obtener una buena muestra son:

1. Lave su boca con agua limpia para eliminar alimentos y otras partículas
2. Inhale profundamente 2 o 3 veces y exhale fuertemente cada vez



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

3. Tosa profundamente para producir el esputo
4. Coloque el recipiente de la muestra cerca a su boca para recolectar la muestra, evite la contaminación fuera del recipiente.
5. Posterior a la toma de muestra, lave sus manos

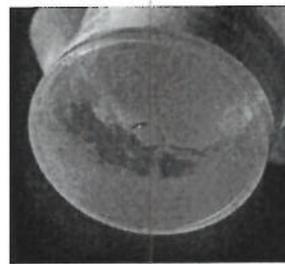
D. Calidad de la muestra:

Obtener una muestra adecuada y de buena calidad así como cantidad suficiente, es vital para asegurar resultados certeros.

Muestra optima: purulenta y mucoide

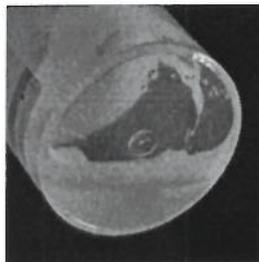


Purulenta

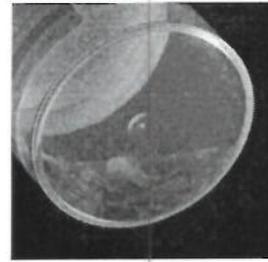


Mucoide

Calidad no adecuada: saliva y sanguinolenta



Saliva



Sanguinolenta

6.10.2 Muestra extrapulmonar:

A. Orina:

La muestra deberá ser colectada previa higiene externa con agua, el paciente debe recoger no menos de 50 ml del segundo chorro de la primera micción de la mañana. Se desecha la primera parte para disminuir la carga de gérmenes contaminantes.

Debe recordarse que la baciloscopia positiva del sedimento de orina no necesariamente es diagnóstico concluyente de tuberculosis, por cuanto existen micobacterias saprófitas en el tracto urinario que pueden producir resultados falsos positivos. El diagnóstico debe ser completado con cultivo e identificación del bacilo observado.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

B. Líquido cefalorraquídeo:

Obtención de la muestra es un procedimiento realizado por el médico especialista.

Cantidad de muestras: todas las que el médico crea conveniente; cuanto mayor es la cantidad de muestras procesadas, mayor es la posibilidad de hallazgo de bacilos.

Envase: estéril de 10-15 ml de capacidad y con tapa a rosca de cierre hermético .

Conservación: es conveniente procesar el material inmediatamente o conservado a 4º C por no más de 12 horas .

C. Líquidos pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros

- La obtención de la muestra es un procedimiento realizado por el médico especialista.
- Cantidad de muestras: todas las que el médico crea conveniente; cuanto mayor es la cantidad de muestras procesadas, mayor es la posibilidad de hallazgo de bacilos.
- Uso de anticoagulante: puede agregarse tres gotas de citrato de sodio al 10% o EDTA (ácido etilén diamino tetraacético) por cada 10 ml de muestra .
- Envase: estéril de 10-15 ml de capacidad y con tapa a rosca de cierre hermético.
- Conservación: enviar lo más rápido posible al laboratorio que realizará el cultivo, eventualmente conservar en refrigeración por no más de 12 horas.

D. Biopsias y material resecado

- La obtención de estos materiales está reservada al personal médico
- En el caso de biopsia de endometrio, la muestra debe consistir preferentemente en raspado uterino tomado durante la primera fase del ciclo menstrual o en el período de ovulación.
- Envase: estéril
- Conservantes: uno o dos mililitros de solución fisiológica o agua destilada estéril para evitar la desecación. No agregar formol porque es letal para el bacilo, la porción de la muestra reservada para el estudio histopatológico debe ser separada para ser preservada en formol al 10% .
- Conservación: el material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio para su cultivo o ser conservado refrigerado y al abrigo de la luz hasta su envío.

E. Pus

- Envase: estéril
- Es preferible no usar hisopos para evitar la desecación . En caso de utilizarlos, antes de la toma de muestra deben ser humedecidos con solución fisiológica o agua destilada estéril.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Conservación: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio que hace el cultivo o ser conservado refrigerado y al abrigo de la luz hasta su envío

6.10.3 Recepción de muestras al laboratorio:

- Inspeccionar las muestras controlando si se han producido derrames.
- Comprobar que las muestras estén bien identificadas.
- Desinfectar la bandeja de transporte de muestras con hipoclorito de sodio al 1% o algún desinfectante como alcohol al 70%.
- Notificar al servicio de PCT, si se han observado inconvenientes especialmente en la calidad y cantidad de los esputos y en la forma de envío.
- En el "Libro de Registro de Baciloscopia" anotar los datos de cada paciente, el tipo y calidad de la muestra recibida, el objetivo del estudio (diagnóstico o control de tratamiento).

6.10.4 Preparación y fijación del extendido:

- Ubicar las muestras en orden numérico dentro de la Cabina de Seguridad Biológica, el contenedor para material contaminado y demás materiales que se van a utilizar en el extendido de la muestra.
- Rotular en el cuerpo del frasco y en su respectiva solicitud de bacteriología el código numérico que corresponde según el "Libro de Registro de Baciloscopia" y registrar la calidad de cada muestra.
- Para cada código de muestra debe haber una lámina rotulada siempre en el extremo y en la cara inferior de la lámina para evitar que se borre durante la tinción. No tocar con los dedos la parte del portaobjetos destinada al extendido.
- Disponer las muestras a la izquierda del operador, o a la derecha, siempre en la misma posición, en orden creciente de numeración. Ubicar las láminas y los palitos preparados y rotulados al lado opuesto de los frascos.
- Tomar la primera muestra, su lámina correspondiente y colocarlas en el medio de la mesa de trabajo (dentro de la cabina) de manera que quede frente al operador
- Destapar con cuidado el envase.
- Con un aplicador (palito de madera cortado) seleccionar la partícula más densa o purulenta de la muestra de esputo.
- Si la muestra contiene varias porciones mucopurulentas, tratar de mezclarlas con movimientos muy suaves del palillo y luego tomar una porción de la mezcla.
- Colocar la(s) partícula(s) seleccionada(s) sobre el portaobjetos y extenderla(s) con el aplicador con movimientos suaves, circulares, tratando de dispersarla en



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un círculo u óvalo de 2 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla.

- Verificar que el extendido tenga grosor homogéneo y adecuado. Si es demasiado fino, es posible producir un resultado falso negativo. Si es muy grueso, el material puede desprenderse durante la coloración o puede resultar difícil la visualización de bacilos debajo de una capa gruesa de mucus.
- Dejar el extendido en un soporte de coloración (varilla de fierro) ubicado a un costado dentro de la Cabina de Seguridad para que seque.
- El extendido no debe ser calentado a la llama mientras esté húmedo pues puede generar aerosoles.
- Desechar el aplicador en un frasco que contenga una solución de hipoclorito de sodio al 1%; este frasco una vez lleno se eliminara junto con los residuos biológicos.
- Continuar de la misma manera con cada una de las siguientes muestras.
- Conservar las muestras hasta terminar las lecturas de la baciloscopía y verificar que no es necesario realizar nuevos extendidos o enviarlas para cultivo.
- Limpiar la superficie de trabajo con una toalla de papel o algodón empapado en alcohol 70°.
- Esperar a que las láminas se hayan secado al aire.
- Una vez que hayan secado las láminas flamear con un mechero tres o cuatro veces cuidando que no se caliente demasiado.

6.10.5 Tinción Ziehl Neelsen

Coloración: Debe haber una distancia entre lámina y lámina, es importante filtrar el colorante fucsina fenicada directamente sobre las láminas con un embudo de plástico y papel filtro.



- Cubrir totalmente la superficie del extendido con fucsina básica fenicada recién filtrada. Dispensar el colorante con suavidad, sin salpicar y sin tocar con el embudo los extendidos
- Con la llama de un hisopo hecho con algodón y embebido en alcohol calentar suavemente por debajo de los extendidos, con movimientos de vaivén, hasta que observe que se desprenden los primeros vapores, realizar este procedimiento tres veces hasta la emisión de tres vapores.
- Dejar actuar por 5 minutos.

Decoloración: Cubrir la totalidad del extendido con solución decolorante y dejar actuar aproximadamente 2 minutos.

- Enjuagar con abundante agua a baja presión.
- Verificar que el extendido se ha decolorado (las partes más gruesas del extendido a lo sumo)



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- conservan un leve tinte rosado). Si se observan cúmulos rojos o coloración rosada intensa, volver a cubrir con solución decolorante, dejarla actuar y enjuagar nuevamente.
- Eliminar el exceso de agua inclinando el portaobjetos.

Coloración de fondo: Cubrir todo el extendido con solución de azul de metileno.

- Dejar actuar durante 30 segundos, enjuagar las láminas en ambas caras con agua a
- baja presión y limpiar la parte inferior con un algodón si ha quedado coloreada.
- Dejar secar las láminas a temperatura ambiente, apoyándolas en posición vertical en un soporte de madera.

Tinción Ziehl Neelsen



CUBRIR CON FUCSINA FILTRADA



CALENTAR HASTA EMISIÓN DE VAPORES TRES VECES DURANTE 5 MINUTOS



LAVAR CON AGUA



CUBRIR CON DECOLORANTE DURANTE 3 MINUTOS



LAVAR CON AGUA



CUBRIR CON AZUL DE METILENO DURANTE 1 MINUTO



LAVAR CON AGUA



SECAR AL AIRE

6.10.6 Observación microscópica y lectura de extendidos:

La observación microscópica se realiza utilizando el objetivo 100X con aceite de inmersión, se buscarán la presencia de bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR) y se cuantificará.

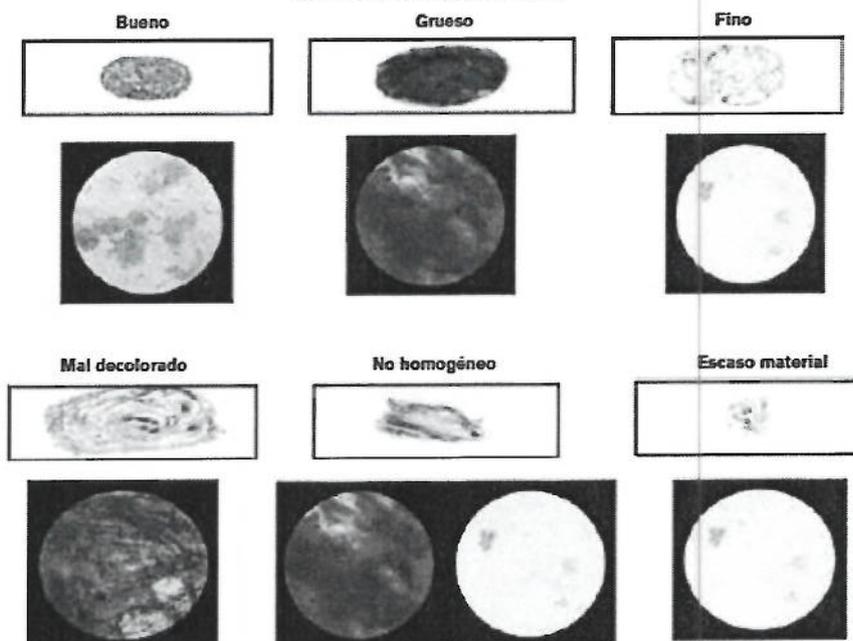


MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA



- Ubicar cerca del microscopio todos los elementos necesarios:
 - aceite de inmersión
 - papel lente
 - el Registro del Laboratorio
 - bolígrafo
 - una caja para guardar las láminas leídas
 - alcohol isopropílico
- Depositar una gota de aceite de inmersión en un extremo del frotis, sin tocar el preparado con
- el gotero.
- Enfocar el extendido donde ha colocado la gota de aceite, con el lente 100x de inmersión
- Observar cada campo microscópico en superficie y profundidad, moviendo permanentemente el tornillo micrométrico, antes de desplazarse al campo contiguo.
- Seguir un recorrido en líneas rectas, sistemático para recorrer el extendido evitando repetir la lectura de algunos campos. Ejm: de izquierda a derecha:
- Observar la calidad del extendido y de la coloración.
- Si no fuesen buenas, repetir nuevamente la baciloscopía de esa muestra.

Calidad del extendido



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Contar el número de campos que ha leído y el número de BAAR que ha identificado.
- Los campos leídos deben ser "campos microscópicos útiles". Se considera campo microscópico útil a aquel en el cual se observan células bronquiales (leucocitos, células ciliadas) o fibras mucosas, que aparecen teñidos de azul. Los campos sin estos elementos no deben ser considerados para contar el total de campos observados, a menos que contengan BAAR.
- Al finalizar la lectura, girar el revolver de los objetivos y retirar el portaobjetos de la platina.
- Comprobar el número de identificación y registrar el resultado.
- Antes de examinar el portaobjetos siguiente, limpiar suavemente la lente de inmersión con papel lente. Esto evita la transferencia de material al siguiente frotis que se va a leer.
- Si encuentra una muy baja carga bacilar con hasta 5 BAAR se recomienda ampliar la lectura a 200 campos, si con esa lectura no se encuentran más bacilos, hacer otro extendido de la misma muestra, tratando de elegir partículas purulentas.
- Si la lectura del segundo extendido no modifica el resultado del anterior, la muestra debe informarse con el número exacto de bacilos observados, consignando en el Libro de Registro el hallazgo y solicitar una nueva muestra, enviar para cultivo muestras con este resultado.

Informe de resultados:

Resultado del examen microscópico	Informe
No se encuentran BAAR en los 100 campos observados	No se observan bacilos ácido alcohol resistentes
Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados	Paucibacilar: N° exacto de bacilos en 100 campos
Se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 campos observados	Positivo (+)
Se observan de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

6.10.7 Descontaminación y desecho del material

- Desechar las muestras colocándolas dentro de una bolsa roja autoclavable.
- Autoclavar al final de cada jornada a 121°C x 15 minutos.
- Si es imposible autoclavar agregar 10 gotas de fenol al 5% al remanente de las muestras no utilizado, dejar los envases tapados hasta el día siguiente, y despacharlos luego con los residuos biológicos habituales del laboratorio.

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

VII. RESPONSABILIDADES.

Jefatura de Apoyo al Diagnóstico: Supervisión y coordinación conjunta de los procesos, procedimientos, y análisis de resultados con la jefatura de laboratorio y encargado de microbiología.

Jefatura de Laboratorio: coordinación conjunta de los procesos, procedimientos, y análisis de resultados con el encargado de microbiología.

Encargado de Microbiología: Realizar, coordinar, verificar, leer los procesos y procedimientos de microbiología descritos en el presente manual.

VIII. ANEXOS

Anexo 01: Determinación de la Actividad Inhibitoria – Urocultivo

Anexo 02: Identificación Bacteriana

Anexo 03: Método de Coloración de Gram

Anexo 04: Formato de Resultado de Mapa Microbiológico



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Anexo 01: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA - UROCULTIVO

1. Principio

Determinar la presencia de sustancias antibacterianas residuales en orina. Este procedimiento se aplica en todos los casos en los que se solicite Urocultivo.

2. Materiales

- Pinzas
- Discos de papel de filtro estériles de Papel filtro Whatman N° 3 o similar 10ul orina sin centrifugar
- Placa de Agar Mueller Hinton 100 x 15 mm
- Tubo con solución salina estéril x 2 MI
- Alicata sacabocados para 6 mm de diámetro
- Cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

3. Procedimiento

- Hacer una suspensión de *Bacillus subtilis* en un tubo con solución salina estéril que sea similar al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland (véase en la sección Susceptibilidad Antimicrobiana)
- Sembrar la placa de agar Mueller Hinton con la suspensión de bacterias de manera similar a un antibiograma.
- Dejar secar a temperatura ambiente aproximadamente 15 min.
- Tomar con la pinza un disco de papel filtro y colocarlo en la placa sembrada según una plantilla numerada o colocando el número en la parte posterior de la placa o colocar 10 µL de orina con una asa calibrada o una micropipeta.
- se debe colocar el número correspondiente a la muestra.
- La placa será incubada a 35°C por 18 horas en aerobiosis.

4. Interpretación

- Se buscará la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco con la orina.
- Cualquier diámetro de halo se considerará como prueba positiva. La ausencia de halo se considera como prueba negativa.

5. Reporte de resultados

El resultado se reporta Actividad Inhibitoria Positiva o Negativo.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Anexo 02: IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

El laboratorio de microbiología tiene responsabilidad de la identificación del microorganismo causante de una infección por lo tanto se describe los procesos realizados y son básicos recomendados para la identificación de las bacterias; se describen pruebas bioquímicas convencionales para la identificación de bacterias. Para la identificación de ellas mismas es necesario considerar las características macroscópicas de las colonias teniendo en cuenta el medio de aislamiento original y sus características microscópicas para poder elegir las pruebas diferenciales correspondientes.

1. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA DE COCOS GRAM POSITIVOS:

Staphylococcus

- Esta diferenciación se realiza basándose en la morfología de la colonia, tipo de hemólisis, forma de las bacterias por coloración Gram a partir de un cultivo y de la prueba de reacción de la catalasa.
- Las colonias de estafilococos son comúnmente grandes (2 mm a 3 mm a las 24 horas), convexas, lisas, enteras, opacas y con frecuencia pigmentadas.
- Los estafilococos pueden ser fuertemente beta hemolíticos en agar sangre pero las zonas de hemólisis son menores en relación al tamaño de las colonias que las generadas por los enterococos y estreptococos hemolíticos.
- Los estafilococos se agrupan generalmente en racimos.

Lectura de cultivos en agar sangre

a) Morfología de las colonias

- Las colonias de *Staphylococcus* son lisas, enteras, algo elevadas. Miden aproximadamente de 1 a 3 mm de diámetro a las 24 horas son de borde entero, de superficie lisa, la mayoría de ellas presentan un pigmento que va desde el amarillo crema hasta el naranja.
- Las colonias de *Staphylococcus epidermidis* son algo más pequeñas dependiendo de las cepas, usualmente no se detecta pigmentos.
- Las colonias de *Staphylococcus saprophyticus* son más grandes que *S. epidermidis*, son lustrosas y más convexas que otras colonias de estafilococos. Un 50% de las cepas son pigmentadas.

b) Coloración Gram

- Hacer una coloración Gram de las colonias sospechosas y observar al microscopio.
- Aplicar el procedimiento descrito en el Anexo 3 .
- Si se observan cocos Gram positivos en racimos, realizar la prueba de la catalasa.

c) Prueba de la catalasa

- Determina la presencia de la enzima catalasa, esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno
- **Reactivo:** Peróxido de hidrógeno al 3%

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- recoger el centro de una colonia pura de 18 a 24 horas y colocarla sobre un portaobjetos limpio.
- Agregar una gota de H₂O₂ al 3% usando un gotero o una pipeta Pasteur.
- Observar una inmediata efervescencia (formación de burbujas) que indica una prueba positiva, de lo contrario se considera la prueba negativa.
- Realizar este procedimiento en forma paralela con cepas controles:
Control positivo: *S. aureus*.
Control negativo: *Streptococcus spp.*
- tener cuidado de no llevar algo del medio de agar sangre debido a que la catalasa presente en los eritrocitos puede dar resultados falsos positivos.
- No invertir el orden porque puede producir resultados falsos positivos.
- Si son catalasa positivas determinar primero si el organismo es o no *Staphylococcus aureus*, para ello se realiza la prueba de la coagulasa.

d) Prueba de la coagulasa

- Se realiza para comprobar la facultad de la bacteria de coagular el plasma por acción de la enzima coagulasa, la cual aumenta la velocidad de coagulación del plasma.
- El resultado final es la formación de un coágulo de fibrina.
- Prueba en tubo (detecta coagulasa libre y ligada) es definitiva.
- **Reactivo:** Plasma
- Transferir una colonia aislada a 0,5 mL de plasma y girar el tubo suavemente para lograr la suspensión del organismo. No agitar.
- Incubar la mezcla a 35 – 37 °C por 4 horas; observar si hay formación de coágulo inclinando lentamente el tubo y observar cuidadosamente si hay formación de coágulo inclinando lentamente el tubo (sin agitar) en intervalos de hasta 4 horas.
- Cualquier grado de coagulación es una prueba positiva. *S. aureus* formarán coágulo en una hora.
- Si es negativa a las 4 horas, seguir incubando hasta el día siguiente a temperatura ambiente se recomienda porque un pequeño número de cepas de *S. aureus* puede requerir más de cuatro horas para la formación del coágulo.

Controles: Positivo: *S. aureus*.

Negativo: *S. epidermidis* o *S. saprophyticus*.

e) Resistencia a la novobiocina

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

Medios y reactivos

- TSA con sangre o agar Mueller Hinton.
- Suero fisiológico o caldo Trypticase soya.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Discos de Novobiocina (5 µg por disco).
- Escala 0,5 de Mc Farland.
- Incubadora a 35–37 °C.

Procedimiento

- A partir de colonias aisladas y cultivadas por 24 horas, hacer una suspensión equivalente a la escala 0,5 de M Mc Farland.
- Sumergir un hisopo estéril dentro de la suspensión ajustada y rotarlo varias veces presionando sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido. Esto removerá el exceso de inóculo del hisopo.
- Inocular sobre la superficie seca de una placa con agar sangre estriando homogéneamente con el hisopo sobre la superficie del agar.
- Repetir el procedimiento dos veces más rotando la placa 90°.
- Dejar de 3 a 5 minutos a temperatura ambiente para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.
- Colocar el disco de novobiocina y presionar suavemente con una pinza estéril.
- Incubar a 35 – 37 °C toda la noche ó 24 horas.

Lectura

- Medir el halo de inhibición. Un halo 16 mm es resistente a la novobiocina, si es mayor entonces es sensible.
- La resistencia a novobiocina es intrínseca en *S. saprophyticus*

Principales características fenotípicas de las especies de *Staphylococcus* comúnmente aisladas en infecciones

	Pigmento de colonia	Hemolisina (*)	Estafilo coagulasa	Factor de aglutinación	Resistencia a novobiocina	Resistencia a polimixina B	Ornitina descarboxilasa	Acidez de manitol
<i>S. aureus</i> subespecie aureus	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>S. epidermidis</i>	-	(d)	-	-	-	+	(d)	-
<i>S. haemolyticus</i>	d	(+)	-	-	-	-	-	d
<i>S. lugdunensis</i>	d	(+)	-	(+)	-	d	+	-
<i>S. saprophyticus</i> subespecie saprophyticus	d	-	-	-	+	-	-	d
<i>S. schleiferi</i> <i>schleiferi</i>	-	(+)	-	+	-	-	-	-
<i>S. varneri</i>	d	(d)	-	-	-	-	-	d

- + 90% o más especies, o cepas positivas.
- 90% o más especies, o cepas negativas.
- d 11% - 89% de especies o cepas positivas.
- (+) Reacción retardada.
- (*) En agar sangre de carnero.
- + Zona amplia de hemólisis dentro de 24 – 36 horas.
- (+) Hemólisis retardada, de una zona moderada a amplia dentro de las 48 – 72 horas.
- (d) No hay hemólisis o es retardada.
- No hay hemólisis o hay una zona muy angosta (≤ 1 mm) dentro de las 72 horas. Algunas de las cepas pueden producir un ligero color verdusco o marrón en agar sangre de carnero.

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Enterococcus

- Esta diferenciación se realiza basándose en la morfología de la colonia, tipo de hemólisis, forma de las bacterias por coloración Gram a partir de un cultivo y de la prueba de reacción de la catalasa.
- Las colonias de estreptococos y enterococos que son más pequeñas (menos de 2 mm de diámetro), puntiformes, con aspecto translúcido a semiopaco.
- enterococos y estreptococos hemolíticos son fuertemente hemolíticos en agar sangre
- Los estreptococos y enterococos que se reúnen en pares o cadenas; también pueden presentarse como células únicas.
- Se ven de forma cocobacilar cuando la coloración de Gram se realiza de una placa de agar y pueden verse en cadenas cuando se prepara la coloración de Gram a partir de caldo Thioglicolato.
- Son anaerobios facultativos y su crecimiento óptimo es a 35 a 37 °C.

Lectura de cultivos en agar sangre

a) Apariencia de las colonias

Usualmente son alfa hemolíticas o no hemolíticas en agar sangre al 5%

b) Coloración Gram (Anexo 3)

Si se observan cocos Gram positivos y se presentan solos, en pares o en cadenas cortas, algunas veces cocobacilares.

c) Prueba de la catalasa: Seguir los procedimientos descritos en la identificación de *Staphylococcus*. *Enterococcus* es catalasa negativo.

d) Prueba de la esulina en medio con bilis

- Inocular el cultivo en estudio haciendo estrías sobre la superficie del pico de flauta o de la placa de agar bilis esulina.
- Incubar a 35 a 37 grados centígrados hasta 72 horas.

Lectura: Positivo: En tubo: Ennegrecimiento difuso en el agar inclinado y Negativo: No se produce ennegrecimiento del medio o ennegrecimiento de menos de la mitad del tubo después de 72 horas de incubación.

–Control negativo: *Staphylococcus aureus*.

–Control positivo: *Enterococcus spp*

Principales características fenotípicas de cocos gran positivos en cadena, catalasa negativos.

	Bilis esulina	Cl Na 6,5%	Crecimiento		Hemólisis
			10 °C	45 °C	
<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	α, β, n
<i>Streptococcus</i>	- ^a	- ^b	-	V	α, β, n
<i>Lactococcus</i>	+	V	+	V	α, n
<i>Vagococcus</i>	+	+	+	V	α, n

- a De los estreptococos viridans 5% - 10% son bilis esulina positivas.
- b Algunos estreptococos β hemolíticos crecen en 6,5% de cloruro de sodio.
- n No hemolítico.
- + ≥ 95% reacciones positivas.
- ≤ 5% reacciones positivas.
- V reacciones variables.

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES

Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter entre otros

Comprende el cultivo e identificación por pruebas bioquímicas de las colonias desarrolladas en agar Mac Conkey. En la cual podemos diferenciar las colonias lactosa positivas y lactosa negativas.

a) Lectura de cultivos en agar Mac Conkey

Lactosa positiva forma colonias de borde entero, de color fucsia, opacas, de 2 mm – 3 mm de diámetro, usualmente rodeadas de una zona opaca alrededor de la colonia (bilis precipitada) algunas de aspecto mucoso según el género

Lactosa negativa dan colonias incoloras de 3 – 4 mm

Las colonias con estas características son subcultivadas en medios diferenciales.

- Pruebas bioquímicas
- Utilización de lactosa
- Utilización de glucosa.
- Producción de gas de glucosa.
- Descarboxilación de lisina
- Producción de ácido sulfhídrico
- Utilización de citrato.
- Producción de ureasa.
- Motilidad.
- Producción de indol.

b) Procedimiento

- Identificar la colonia sospechosa que se encuentra en la placa de agar Mc Conkey.
- Obtener la colonia seleccionada 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 agar citrato, urea (en la superficie), TSI, LIA (introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, retirar por el mismo trazo y sembrar en estría la parte inclinada)
- Sembrar por puntura en el centro del agar movilidad hasta una profundidad aproximada de 1,5 cm incubar a 35 – 37 °C de 18 a 24 horas.

c) Lecturas

Agar TSI

En estos medios se determina la capacidad de la bacteria de utilizar la lactosa, glucosa y sacarosa (en TSI), con producción o no de gas y la producción de ácido sulfhídrico; hacer la lectura entre las 18 – 24 horas. La lectura se hace sobre la base de tres características:

- Utilización de hidratos de carbono, producción de gas y producción de ácido sulfhídrico.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

- Utilización de hidratos de carbono:
 - o lactosa: Reacción ácida en el pico de flauta (color amarillo) Abreviatura: (A)
 - o glucosa: Reacción ácida en la columna del medio (color amarillo) Abreviatura: (A).
 - o No hay utilización del carbohidrato: Se puede observar una reacción alcalina (color rojo) o que no hay cambio de color (permanece del mismo color que el medio no inoculado) Abreviaturas: (K) o (N) respectivamente.
 - o Cuando se produce H₂S el precipitado negro oculta la acidez.
 - o Producción de gas de glucosa:
 - Se considera positivo: Presencia de una sola burbuja de gas, burbujas en el medio o completo del medio del fondo del tubo
 - Se registra la lectura por medio de cruces (+)
 - o Producción de ácido sulfhídrico: color negro distribuido por todo el medio de cultivo o sólo una parte y se registra por medio de cruces
 - o Si no se observa cambio de color en el tubo hasta las 24 horas, seguir incubando hasta las 48 horas. Si no se observa viraje de color y hay desarrollo, se trata de una bacteria no fermentadora

K/A →: Significa alcalinidad en la inclinación y acidez en el fondo (fermentación de glucosa), gas negativo y H₂S positivo.

N/N →: Significa que no hay utilización de la lactosa y glucosa ni producción de H₂S.

Controles

	Columna vertical (fondo)	Superficial inclinada (Pico de flauta)
<i>E. coli</i> (lactosa positivo)	amarillo/gas	amarillo
<i>Shigella</i>	amarillo/sin gas	rojo
<i>Salmonella paratyphi B</i>	amarillo/negro/con gas	rojo

Agar lisina hierro (LIA)

En este medio se determina simultáneamente la producción de lisina descarboxilasa y de la formación de ácido sulfhídrico.

Lectura se hace entre las 18 – 24 horas; si la lectura se realiza antes podemos obtener resultados falsos positivos, así como falsos negativos si se lee después de las 24 horas.

Realizar la lectura en la columna y en la superficie inclinada y observar la formación de ácido sulfhídrico el cual se evidencia por una coloración negra

Generalmente las cepas del grupo *Proteus* y *Providencia*, desaminan la lisina a ácido cetocarbónico. Este último forma compuestos pardo-rojizos en la región superficial del medio de cultivo con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno.

	Columna vertical (fondo)	Superficial inclinada (Pico de flauta)
<i>E. coli</i>	amarillo	violeta
<i>Proteus mirabilis</i>	amarillo y negro	rojo-parduzco
<i>Morganella morganii</i>	amarillo	rojo parduzco-violeta

Utilización de citrato

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



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Procedimiento

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

Resultados

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

Positivo: *Enterobacter cloacae*
Negativo: *Escherichia coli*

Hidrólisis de la Urea (producción de ureasa)

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

Procedimiento

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

Resultados

Prueba positiva: Color rosado intenso en el pico de flauta o todo el agar. Puede haber una reacción positiva retardada después de 24 horas y hasta 6 días de incubación (algunas cepas de *Klebsiella* por ejemplo).

Prueba negativa: No se produce cambio de color.

Negativo: *Escherichia coli*
Positivo: *Klebsiella pneumoniae*

Motilidad (Medios SIM, o MIO o agar movilidad)

Para determinar si un organismo es móvil o inmóvil.

Procedimiento: Incubar a 35 – 37 °C de 24 a 48 horas.

Resultados

Positivo: Los microorganismos migran de la línea de siembra y se difunden en el medio provocando turbidez.

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

Control positivo: *Escherichia coli*.
Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*.

Prueba de indol

Microorganismo que producir indol a partir del aminoácido triptófano.

Medios y reactivos: En el medio Mio el microorganismo en crecimiento previa lectura y el Reactivo de indol de Kovacs.

Procedimiento



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

De un cultivo de 24 horas de incubación agregar 5 gotas de reactivo de Kovacs y mover suavemente el tubo y realizar la lectura; si la lectura es negativa, deberá incubarse otras 24 horas el cultivo restante y repetirse la prueba.

Resultados

Prueba positiva: Formación de un anillo rojo en la superficie del medio

Prueba negativa: No se produce color en la capa alcohólica, y toma el color del reactivo empleado.

Control positivo: *Escherichia coli*.
Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*.

IDENTIFICACIÓN DE BACILO GRAM NEGATIVO NO FERMENTADOR

Pseudomonas aeruginosa

Es fácilmente reconocida en medios de aislamiento primario por sus características:

- Morfología de la colonia
- Producción de pigmentos
- Olor característico.

Morfología de las colonias: las colonias generalmente son planas, algo extendidas, bordes aserrados y tienen un brillo metálico; Algunas cepas de *P. aeruginosa* pueden no producir pigmentos, frecuentemente estas cepas son bastante mucoides y se aíslan a partir de muestras de secreciones respiratorias

Determinación de las características bioquímicas: Identifica la colonia sospechosa y se realizar las siguientes pruebas:

- Utilización de lactosa. Utilización de glucosa. Prueba de oxidasa. Utilización de citrato.

Procedimiento

- Identificar la colonia sospechosa que se encuentra en la placa de agar Mc Conkey.
- Obtener la colonia seleccionada 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 agar citrato (en la superficie), TSI, LIA (introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, retirar por el mismo trazo y sembrar en estría la parte inclinada etc.

Lecturas

a) **Agar TSI:** *P. aeruginosa* da una reacción: K/K o N/N y no hay producción de sulfuro de hidrógeno.

b) **Prueba de utilización de citrato:** el 95% de cepas de *P. aeruginosa* son positivas.

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

MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Reactivos: N, N, N, N, tetrametil-p fenilenediamina o N, N, dimetil-p fenilenediamina solución acuosa al 1%. (o las tiras comerciales)

Procedimiento: la cepa procediendo de un cultivo en agar TSA y Muller Hinton se coloca un poco en un trozo de papel de filtro con el reactivo dentro de una placa petri y con la ayuda de un mondadiente se extiende sobre el papel filtro.

Positivo: P. aeruginosa Negativo: E. coli

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

Negativo: No hay viraje de color.



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Anexo 03

METODO DE COLORACIÓN DE GRAM

FIJACIÓN DE LA MUESTRA: Los frotis pueden ser fijados al calor o con metanol.

a. Calor

- Dejar secar el frotis en una superficie plana a 37 grados
- Dejar enfriar la lámina antes de colorear.

b. Metanol

La fijación por metanol previene la lisis de los glóbulos rojos brindando una visualización más clara del campo.

También previene el arrastre de las muestras de orina.

- Dejar secar el frotis en una superficie plana.
- Colocar unas cuantas gotas de metanol y dejar un minuto
- Eliminar el restante y secar la lámina al aire.
- No usar calor antes de colorear.

c. Procedimiento

- a) Preparar un extendido fino del material en estudio y dejarlo secar
- b) Fijar el material con metanol y dejar secar.
- c) Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
- d) Colorear un minuto y lavar con agua de caño.
- e) Cubrir la lámina con lugol de Gram durante un minuto. Lavar nuevamente con agua.
- f) bañar la superficie con unas gotas de alcohol acetona hasta no arrastrar más colorante violeta. Generalmente requiere de unos diez segundos o menos y lavar con agua de caño
- g) Cubrir la superficie con safranina durante un minuto. Lavar con agua de caño.
- h) Dejar secar la lámina.
- i) Examinar la lámina coloreada al microscopio con objetivo 100 x de inmersión (aceite).



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

Anexo 04

FORMATO DE RESULTADO DE MAPA MICROBIOLÓGICO

MAPA MICROBIOLÓGICO DEL HOSPITAL DE VITARTE

VIGILANCIA MICROBIOLÓGICA

Servicio de Apoyo al Diagnóstico - Área de Laboratorio Servicio de Microbiología determinará la presencia y ausencia de microorganismos patógenos, proporciona el perfil de incidencia bacteriana a través del Mapa Microbiológico; Servirá para brindar información analizada que puede ser utilizada en las decisiones de terapia antimicrobiana.

Fecha de Toma de Muestra	
Hora de Toma de Muestra	
Fecha de Entrega de Informe Final	

Técnica: Cualitativa (presencia y ausencia)

Zona de Muestreo:

AREA EXAMINADA	COLORACION GRAM	GERMEN AISLADO
	•	•
	•	•
	•	•
	•	•
	•	•

MUESTREO AMBIENTAL	COLORACION GRAM	GERMEN AISLADO
	•	•
	•	•
	•	•



MANUAL OPERATIVO ESTANDARIZADO DE MICROBIOLOGÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Koneman, Elmer; "Diagnostico Microbiológico: Texto y atlas color"; Quinta Edición; Editorial Medica Panamericana; 2006.
- Guevara M, Urcia F, Casquero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2007. Serie de Normas Técnicas N° 44.
- Andreu, A., J. Cacho, A. Coira y J. A. Lepe. 2011. Diagnostico microbiológico de las infecciones del tacto urinario. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29:52-57
- Cavagnaro F. Infección urinaria en la infancia. 2005. *Rev Chil Infect.* 22:161-168. Comité de Microbiología Clínica. Sociedad Chilena de Infectología. 2001.
- De Cueto M. 2005. Diagnostico microbiológico de la infección del tracto urinario. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23 (Supl. 4): 9-14
- Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica: recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología
- Herrera, D., P. Lopez, J. L. Duque., L. Perez, R. Golding, y C. Hernandez. 2010. Asas metálicas calibradas para microbiólogos: una alternativa de fabricación nacional. *Rev. Soc. Venezol. Microbiol.* 30:37-42.
- Sociedad Española de Nefrología. Marzo 2006. Coordinador Dr. Rafael Perez García. Guías de Gestión de calidad del líquido de diálisis. 5. Weinstein RA, Hota B. Contamination, disinfection and cross colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection *Clin Infect Dis* 2004; 39:1182-1189.
- Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene y el INSALUD. Recomendaciones para la verificación de la bioseguridad ambiental (BSA) respecto a hongos oportunistas. Madrid, 20 de marzo de 2000.
- Eliecer M, Dominguez MA, Ezpeleta C, Padilla B, Ramirez de Arellano E, Martinez-Martinez L. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:220-229.
- Organización Mundial de la Salud. Guía práctica de prevención de las infecciones nosocomiales. 2ª edición. 2003; 26-29.
- Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram Negativos no fermentadores de importancia clínica; Recomendaciones de la Subcomision de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica. Asociación Argentina de Microbiología. Marcela Radice ; Marcelo Marín ; Marta Giovanakis ; Carlos Vay .*Revista Argentina de Microbiología* 2011, 43

