

MINISTERIO DE SALUD



Dirección General

## RESOLUCION DIRECTORAL

N° 044-2011-DG-HVLH

Magdalena del Mar, 21 de Marzo del 2011

Vistos, en la Nota Informativa N° 037-OEPE-HVLH-2011, el Memorando N° 031-OGC-HVLH-2011 y el Memorando N° 025-DAMC-HVLH-2011;

### CONSIDERANDO:

Que, mediante la Ley N° 27657, Ley Orgánica del Ministerio de Salud, establece que el Ministerio de Salud diseña y organiza procesos organizacionales de dirección, operación y apoyo. Los subprocesos y actividades componentes se modifican en función de las innovaciones tecnológicas y la reformulación de los objetivos estratégicos los mismos que se establecen en el Reglamento de la presente Ley y en los Reglamentos Orgánicos Subsecuentes;

Que, el artículo 8° del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital " Víctor Larco Herrera ", aprobado mediante Resolución Ministerial N° 132-2005/MINSA, determina los objetivos funcionales generales asignados al Hospital, siendo entre ellos, incisos d) Mejorar continuamente la calidad, productividad, eficiencia y eficacia de la atención de psiquiatría y salud mental, estableciendo las normas y los parámetros necesarios, así como generando una cultura organizacional con valores y actitudes hacia la satisfacción de las necesidades y expectativas del paciente y su familia, y g) Administrar los recursos humanos, materiales económicos y financieros para el cumplimiento de la Misión y sus Objetivos en cumplimiento de las normas vigentes;

Que, el artículo 26° del precitado Reglamento, establece que el Departamento de Apoyo Médico Complementario, es la Unidad orgánica encargada de prestar atención médica integral y especializada, complementaria a la atención psiquiátrica, a los pacientes del Hospital; depende de la Dirección General y tiene asignado Objetivos principales, siendo entre ellos, incisos a) Brindar atención médica integral y especializada, complementaria a la atención psiquiátrica, a los pacientes del Hospital en las especialidades de Neurología, Genética, Patología Clínica y Anatomía Patológica, Radiología, Medicina Interna, Geriatria, Ginecología, Cirugía, Dermatología, Odontostomatología y otras especialidades médico no psiquiátricas, en condiciones de oportunidad, con eficiencia y calidad, y d) Estimular, orientar y monitorear la investigación en el campo de su competencia, así como apoyar la docencia, en el marco de los convenios correspondientes;

Que, mediante Resolución Ministerial N° 826-2005/MINSA, se aprobó las "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", siendo entre ellas, el Manual, tal como lo señala en el numeral 6.1.4 Manual;

Que, mediante documentos de vistos, la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico, solicita a esta Dirección General la aprobación del Manual de Normas de Procedimientos Microbiológicos del Departamento de Apoyo Médico Complementario del Hospital " Víctor Larco Herrera "

Que, siendo el Manual de Normas de Procedimientos Microbiológicos un instrumento descriptivo y de sistematización normativo en la sección de Microbiología del Servicio de Laboratorio Clínico del



Ministerio de Salud  
Hospital Víctor Larco Herrera  
Dirección General  
MAGDALENA DEL MAR  
21 de Marzo del 2011

Departamento de Apoyo Médico Complementario, cuya finalidad es ser una guía para el personal dedicado a la Microbiología Clínica;

Que, en consecuencia por convenir a los intereses funcionales institucionales que permitan un mejor cumplimiento de los fines y objetivos de la institución, resulta necesario, formalizar la aprobación del Manual de Normas de Procedimientos Microbiológicos del Departamento de Apoyo Médico Complementario del Hospital " Víctor Larco Herrera ", mediante la emisión del correspondiente acto de administración;

Estando a lo informado por el Jefe del Departamento de Apoyo Médico Complementario;

Con la visación del Jefe del Departamento de Apoyo Médico Complementario, del Director de la Oficina de Asesoría Jurídica, del Director de la Oficina de Gestión de la Calidad y de la Directora de la Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico del Hospital " Víctor Larco Herrera ";y,

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

**SE RESUELVE:**

**Artículo 1º.-** Aprobar el **Manual de Normas de Procedimientos Microbiológicos** del Departamento de Apoyo Médico Complementario del Hospital " Víctor Larco Herrera ", el mismo que consta de ciento cuarenta y nueve (149) páginas, y que forma parte integrante de la presente Resolución.

**Artículo 2º.-** Encargar al Jefe de Departamento de Apoyo Médico Complementario; la difusión, supervisión e implementación del Manual de Procesos y Procedimientos del Departamento de Apoyo Médico Complementario del Hospital "Víctor Larco Herrera".

**Artículo 3º.-** Disponer a la Oficina de Comunicaciones la publicación de la presente Resolución en el portal de Internet del Hospital " Víctor Larco Herrera ".

Regístrese y comuníquese

EJMR/HRS/JJH/FJA.  
Distribución:

- Oficina Ejecutiva de Planeamiento Estratégico
- Oficina de Gestión de la Calidad
- Oficina de Asesoría Jurídica
- Dpto. de Apoyo Médico Complementario
- Archivo

MINISTERIO DE SALUD  
HOSPITAL "VICTOR LARCO HERRERA"  
  
Dr. EDGAR J. MIRAVAL ROJAS  
DIRECTOR GENERAL  
C.M.P. 19027 R.N.E. 8617

---

**HOSPITAL "VÍCTOR LARCO HERRERA"**

Av. Pérez Aranibar N° 600 Magdalena del Mar

---

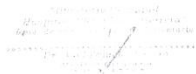
**MANUAL DE NORMAS DE  
PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS**

MNPM: 00.01.2010

**Elaboración de los Procedimientos de  
Exámenes solicitados en la Sección:  
Microbiología**

2008-03-30 a 2010-05-31  
Primera Edición  
TM: JMGR

**Descriptores:** Documentación, Procedimientos



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
1. OBJETIVO	7
2. FINALIDAD	7
3. BASE LEGAL	7
4. ALCANCE	8
5. GENERALIDADES	
5.1. Fase Preanalítico	8
5.1.1. CONDICIONES GENERALES PARA LA OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRA	8
5.2. Fase Analítica	9
5.2.1. CONSIDERACIONES DURANTE LOS PROCEDIMIENTOS	10
5.3. Fase Post Analítico	11
6. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS	12
6.1. Procedimientos Generales	12
6.1.1. NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN LA SECCIÓN: MICROBIOLOGÍA	12
6.1.2. ELIMINACIÓN DE MATERIALES CONTAMINADOS	15
6.1.3. LIMPIEZA DEL MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO	16
6.1.4. CONTROL DE CENTRÍFUGA Y BAÑO MARÍA	20
6.1.5. CONTROL DE INCUBADORA – AUTOCLAVE	22
6.1.6. CONTROL DE CABINA SEGURIDAD	24
6.1.7. CONTROL DE REFRIGERADORAS Y MICROSCOPIO	26
6.1.8. CONTROL DE BALANZA ANALÍTICA	27

<b>6.2. MEDIOS DE CULTIVO</b>	28
6.2.1. MEDIOS SÓLIDOS	28
6.2.2. MEDIOS LÍQUIDOS	30
6.2.3. MEDIOS DE TRANSPORTE	31
6.2.4. MEDIOS DIFERENCIALES	32
6.2.5. OTRAS PRUEBAS	33
<b>6.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS</b>	34
6.3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE PARA CULTIVO	34
6.3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ORINA (UROCULTIVO)	36
6.3.3. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE HERIDA, HERIDA OPERATORIA, ÚLCERAS	40
6.3.4. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ABSCESO POR ASPIRACIÓN CON AGUJA	42
6.3.5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS	44
6.3.6. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR	46
6.3.7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TRACTO GENITAL	48
6.3.8. OBTENCIÓN DE MUESTRAS: HECES	52
<b>6.4. ENVÍO Y TRANSPORTE DE MUESTRA</b>	54
6.4.1. CRITERIOS PARA RECHAZAR UNA MUESTRA	56
<b>6.5. PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO</b>	58
6.5.1. SIEMBRA DE MUESTRA DE ORINA	58
6.5.2. SIEMBRA DE MUESTRA DE SANGRE: HEMOCULTIVO	61
6.5.3. SIEMBRA DE MUESTRA DE HERIDA, HERIDA OPERATORIA, ÚLCERAS, ABSCESOS	63
6.5.4. SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECIONES DE VÍAS RESPIRATORIA ALTA	65
6.5.5. SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECIÓN DE VÍA RESPIRATORIA BAJA	67
6.5.6. SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DEL TRACTO GENITAL	69

---

6.5.7. SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA: HECES – COPROCULTIVO	71
<b>6.6. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA</b>	<b>73</b>
6.6.1. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA DE COCOS GRAM POSITIVOS:	73
6.6.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES	73
6.6.1.2. LECTURA DE CULTIVOS EN AGAR SANGRE DE CARNERO Y AGAR COLUMBIA CNA-SANGRE: <i>Staphylococcus</i>	74
6.6.1.3. LECTURA DE CULTIVOS EN AGAR SANGRE DE CARNERO Y AGAR COLUMBIA CNA – SANGRE: <i>Streptococcus</i>	77
6.6.1.4. LECTURA DE CULTIVO EN AGAR SANGRE DE CARNERO Y AGAR COLUMBIA CNA SANGRE: ENTEROCOCOS	81
6.6.1.5. LECTURA DE CULTIVO EN AGAR CHOCOLATE + SUPLEMENTOS Y/O AGAR SELECTIVOS PARA GONOCOCO	83
6.6.2. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA DE COCOS BACILOS GRAM NEGATIVOS	84
6.6.2.1. Lectura de Cultivos en Agar Mac Conkey	85
6.6.2.2. Lectura de Cultivos en Agar TCBS	85
6.6.2.3. Lectura de Cultivos en Agar Mac Conkey: Bacterias especiales	86
6.6.2.4. Lectura de cultivos en Agar Sangre: Otras Bacterias	86
6.6.2.5. Bacterias que necesitan nutrientes adecuados y suplementos que inhiben a otros gérmenes	86
6.6.2.6. Pruebas Bioquímicas	87
6.6.2.7. Procedimiento	87
6.6.2.8. Lecturas	88
<b>7.0. PRUEBAS SEROLÓGICAS DE IDENTIFICACIÓN</b>	<b>96</b>
7.1. Condiciones Generales	96
7.2. Uso de los Sueros Inmunes	98
<b>8.0. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICO</b>	<b>102</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>104</b>

<b>ANEXOS</b>	105
ANEXO N° 1: PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LIMPIEZA DE MATERIAL DE VIDRIO – PLÁSTICO	106
ANEXO N° 2: MANEJO Y FUNCIONAMIENTO DE AUTOCLAVE (Esterilización por vapor a presión)	107
ANEXO N° 3: AGUA PARA LABORATORIO CLÍNICO	108
ANEXO N° 4: CUADRO DE RIESGO DE INFECCIÓN DE DIVERSOS PROCEDIMIENTOS EN LA SECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA, REVELADOS POR TÉCNICAS DE MUESTREO DE AIRE	109
ANEXO N° 5: TOMA DE MUESTRAS	110
ANEXO N° 6: MANEJO DE CABINA DE SEGURIDAD CLASE II	111
ANEXO N° 7: MANEJO DE BALANZA ANALÍTICA	112
ANEXO N° 8: PRUEBAS BIOQUÍMICAS: RECOMENDACIONES	113
ANEXO N° 9: ASAS DE SIEMBRA RECOMENDADAS PARA CADA MÉTODO DE MUESTRAS DE ORINA	114
ANEXO N° 10: SIEMBRAS POR DISPERSIÓN AGOTAMIENTO	115
ANEXO N° 11: COLORACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO	116
FLUXOGRAMAS	128
REGISTROS	142



## INTRODUCCIÓN

Las infecciones cada vez más constituyen un problema de salud pública ya sea por su efecto en la salud de los pacientes, como los costos que genera este problema. Los pacientes presentan una gran variedad de signos y síntomas algunos de ellos pueden ser evidentes y fáciles de reconocer; otros pasan desapercibidos, por lo que el médico debe basarse en evidencias disponibles; como los aspectos epidemiológicos y la importante contribución del Laboratorio Microbiológico.

El Laboratorio Clínico de Microbiología requiere para su correcto funcionamiento de un adecuado y constante control sobre todo en las etapas de recepción, manejo y reporte de especímenes clínicos. Este control debe identificar, monitorear, evaluar y aprobar metodologías relativas al cuidado del paciente.

En este contexto en Microbiología Clínica debe existir un control en los procedimientos: medios de cultivos, reactivos, instrumentos, métodos y el personal para asegurar una adecuada práctica en el aislamiento, identificación y caracterización de agentes etiológicos y su respectiva susceptibilidad a los antibióticos como guía terapéutica.

Para el éxito de la sección de microbiología lo más importante, es la actitud con que el profesional tecnólogo médico o profesional especializado técnico se presenta al laboratorio, si muestra interés de desprendimiento de conocimientos y dedica tiempo y esfuerzo encontrará infinitas experiencias gratificantes como profesional esto nos indicará qué tan bueno es nuestro trabajo y la generación de información clínica oportuna y rápida.

El presente Manual de Procedimientos reconoce que la sección de Microbiología es responsable de aplicar los procedimientos y técnicas necesarias para el apoyo diagnóstico y debe ser aplicado por el personal que labora en el SAD – SLC.



## 1. OBJETIVO

- a) El presente Manual de Procedimientos Microbiológicos es el instrumento descriptivo y de sistematización normativo en la Sección de Microbiología del Servicio de Laboratorio Clínico.
- b) Establecer los procedimientos de diagnóstico bacteriológico y susceptibilidad antimicrobiana de los agentes etiológicos más frecuente de infecciones intrahospitalaria y en la comunidad.
- c) Asegurar que el producto final tenga un grado aceptable de conformidad con los límites establecidos.
- d) Guarda coherencia con los dispositivos de validación usadas en las diferentes entidades del MINSA – INS.

## 2. FINALIDAD

El presente manual tiene como finalidad de ser una guía para el personal dedicado a la Microbiología Clínica, una disciplina de las ciencias de laboratorio en constante evolución que va a la par del progreso de la medicina moderna.

## 3. BASE LEGAL

- D.S. N° 005-90-SA Reglamento de Hospitales del Sector Salud. RM 283-99 SA/DM 10.6.99; establecer normas y sanciones para control de medidas de seguridad y sanciones en relación con la obtención, conservación y/o suministros de sangre.
- RJ N° 059-77 INAP/DNR-D. 002-77 DNR, Normas para la formulación de Manuales de Procedimientos.
- MPR – CNLSP-004 15.03.2001 Serie de Normas Técnicas N° 28 092-2001-J-OPD/INS.
- MPR-CNLSP-Serie de Normas Técnicas N° 15 Ed. 1997.



#### 4. ALCANCE

La aplicación de este manual está dirigido a todos los integrantes del SAD – SLC y su conocimiento es obligatorio y las recomendaciones indicadas es responsabilidad de cada personal.

#### 5. GENERALIDADES

Para la preservación de la calidad en la sección: Microbiología dentro del SAD – SLC; se debe tener en cuenta lo siguiente:

##### 5.1. Fase Preatalítico

###### 5.1.1. CONDICIONES GENERALES PARA LA OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRA

- 5.1.1.1. Elegir el lugar correcto a partir del cual se obtendrá la muestra empleando la técnica apropiada. Es decir, debe obtenerse la muestra del sitio de infección identificado por medio de una técnica aséptica que asegure la no contaminación de la muestra con la flora normal.
- 5.1.1.2. Obtener una suficiente cantidad de muestra para asegurar el aislamiento del germen relacionado con el proceso infeccioso en estudio y evitar los resultados falsos negativos.
- 5.1.1.3. Obtener la muestra antes del inicio de la terapia antimicrobiana si el paciente hubiera recibido alguna dosis del antimicrobiano al momento de la muestra, el laboratorio debe ser informado.
- 5.1.1.4. Enviar al laboratorio inmediatamente después de haber sido obtenidas para su procesamiento, con el objeto de incrementar la probabilidad de recuperación de los microorganismos involucrados en el proceso infeccioso.
- 5.1.1.5. Las muestras se colocan en un recipiente secundario apropiado para su transporte al laboratorio, para evitar cualquier derrame y por lo tanto los riesgos que de ello se deriven.

- 5.1.1.6. El paciente debe ser informado en forma clara y sencilla de acuerdo a su grado de instrucción sobre los procedimientos a realizar (Pac. Ambulatorios – hospitalizados).
- 5.1.1.7. Identificación correcta del paciente por el profesional que recepciona las muestras (nombre e identificación de la etiqueta o rótulo de la muestra y de la forma de la solicitud deben concordar uno con otro y con el paciente correcto).
- 5.1.1.8. Debe registrarse la hora de la toma de muestra en el documento apropiado (solicitud, formato de exámenes).

## 5.2. Fase Analítica

### 5.2.1. CONSIDERACIONES DURANTE LOS PROCEDIMIENTOS

- 5.2.1.1. Verificar que los medios de cultivo estén correctamente conservados en refrigeración con bolsa chequera.
- 5.2.1.2. Atemperar en incubadora por 30 minutos (los medios selectivos y/o nutritivos) antes de cultivar las muestras.
- 5.2.1.3. Verificar las temperaturas de las unidades de: Incubadoras, esterilizadores, refrigeración, baño María 37°C, 45 C, 60°C.
- 5.2.1.4. Verificar el funcionamiento de la cabina Clase II y su pulcritud antes y después de los procesos de cultivo.
- 5.2.1.5. Verificar las temperaturas de ambiente y humedad del stock de medios de cultivos liofilizados, granulados, etc.
- 5.2.1.6. Verificar la precisión de las velocidades de centrifugación y dispositivos de tiempo.
- 5.2.1.7. Mantener preventivamente los instrumentos a usar: asa de kolle, tijeras, pinzas, base Gaspak.
- 5.2.1.8. Verificar puntos de gas del mechero Bunsen.

- 5.2.1.9. Verificar los reactivos que estén correctamente etiquetados, N° de lote, fecha de preparación y expiración.
- 5.2.1.10. Verificación de fechas de elaboración de insumos y/o media revisando el cuaderno stock – microbiología.
- 5.2.1.11. Conservar las muestras: Ejm.: orinas (separar en un tubo de 13 x 100 estéril 7 ml de la muestra y guardar en refrigeración) hasta concluir los procedimientos. Heces (en medio de transporte; en temperatura ambiente hasta concluir los procedimientos). Secreciones (en medio de transporte; en temperatura ambiente, en medio de preservación: en temperatura de congelación).
- 5.2.1.12. Verificar la existencia de agua en el autoclave y su limpieza, antes de usarlo.
- 5.2.1.13. Descartar los deshechos, utensilios descartables, guantes, máscaras; en bolsa de color rojo.
- 5.2.1.14. Desechar los cultivos: placas con crecimiento bacteriano colocarlo sobre una riñonera y llevar al autoclave.
- 5.2.1.15. Descartar las láminas de frotices coloreadas en lejía al 2% x 20 minutos; luego retirar con pinzas, luego autoclavar.
- 5.2.1.16. Descartar los caldos de enriquecimiento, suero fisiológico o de transporte, asegurando bien los tampones de algodón, forrado con gasa; (colocarles flojos); luego llegar a autoclavar.
- 5.2.1.17. Desechar las muestras:  
Orina: Colocar lejía al 2% y reposar 20 minutos, luego deshechar al desagüe.  
Heces: tapar herméticamente y colocar dentro de una bolsa y llevar al autoclave.  
Sangre: como base – suplemento para preparar agares; colocarlo en frasco de tapa rosca, boca ancha agregar lejía al 2% por 20 minutos, depositarlo en una bolsa luego llevar a autoclave.

- 5.2.1.18. Documentar: uso de cuadernos para registrar las muestras comprobando muestra y orden, el uso de protocolos, folletos manuales para su lectura de cada uno de los procedimientos, de acuerdo a la solicitud médica.
- 5.2.1.19. Responsabilidades: El Jefe del Servicio de Laboratorio Clínico es el encargado de supervisar que se cumpla el presente manual.  
Los responsables de la sección: Tecnólogo Médico y/o ASSI programadas darán cumplimiento del presente manual.

### 5.3. Fase Post Analítico

- 5.3.1. Verificar la especie encontrada en los reportes finales (consultar tabla de diferenciales bioquímicos – especie).
- 5.3.2. Revisar el listado de antibióticos (susceptibilidad antibiótica: sensible, intermedio, resistencia) en los reportes para detectar errores de transcripción en formulario de resultados.
- 5.3.3. Que los reportes sean fáciles de leer e interpretar.
- 5.3.4. Proceder para informar al médico de los resultados que requiere atención inmediata; antes de entregar reporte al personal que trabaja en pabellones – UCI – Emergencia.
- 5.3.5. Vigilar que se reporte en el momento preciso los resultados en la historia clínica del paciente.
- 5.3.6. Verificar que el médico interprete bien los resultados correctamente de las investigaciones en el laboratorio.
- 5.3.7. Mantener interacción con los médicos tratantes y a su vez con los jefes de pabellón – UCE – Emergencia, con la finalidad de asegurar que el paciente reciba cuidado directo de buena calidad como resultado de los procedimientos en el laboratorio.

## 6. DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

### 6.1. Procedimientos Generales

#### 6.1.1. NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN LA SECCIÓN: MICROBIOLOGÍA

Unidad Orgánica: DSMC – SAD – SLC – HVLH.

**Código N° 001**

Sección Microbiología

#### Definición:

Es una medida de protección de seguridad frente a agentes infecciosos externos.

#### Objetivo:

Realizar en forma adecuada y correcta la orientación lo que es bioseguridad; para disminuir la transmisión de los gérmenes; y lo adopte como un código de prácticas en el trabajo.

#### Procedimiento

1. Se asume que todo material biológico con el que se trabaja en el área es potencialmente infectado.
2. Está prohibido: comer, fumar, y maquillarse en el área de trabajo.
3. Usar mandil de preferencia abrochadas por detrás en lo posible.
4. Cuando hay peligro de contaminación manual por los procedimientos o agentes usados, llevar guantes o pinzas.
5. No se debe pipetear con la boca material infeccioso (muestras, cultivo, etc.); use micropipeta, pipeta Pasteur.
6. Use mascarillas N100, N95, en lo posible para agentes infecciosos.
7. Lavarse las manos después de manipular material infeccioso y también al salir del laboratorio.
8. El laboratorio siempre estará ordenado, limpio y libre de todo el material que no corresponda al trabajo rutinario.

9. Las mesas de trabajo serán decontaminadas por lo menos una vez al día y después de cada procedimiento con material contaminado.
10. Desarrollar el hábito de mantener las manos lejos de la boca, la nariz, los ojos y la cara. Así puede prevenirse la autoinoculación.
11. Es preciso evitar los aerosoles y salpicaduras (centrifugación).
12. Todos los desechos contaminados y elementos no desechables, decontaminar antes de eliminar.
13. Limpiar periódicamente la refrigeradora (la parte del congelador) donde se guardan los cultivos, quitar las ampollas o tubos rotos. No olvidar de usar guantes y máscara al hacerlo.
14. Antes de centrifugar verificar el interior de tubos o cubetas que no exista vidrios rotos u otro material y a su vez de los tubos con muestra para evitar roturas y derrame de la muestra. Si es necesario usar un germicida y limpiar los tubos y tubos de centrifuga.
15. El acceso al laboratorio debe ser restringido, solo personal autorizado.
16. Es preciso denunciar de inmediato todos los accidentes o incidentes y tomar medidas necesarias para prevenir en el futuro.
17. Las áreas de trabajo donde se produce derrame, roturas de placas con cultivo; tubos de enriquecimiento con muestras de estudio usar inmediatamente con hipoclorito de Na 0.5 ó 1.0% usar guantes al hacer la limpieza.
18. El material destino a eliminar debe estar en bolsas etiquetadas.
19. El personal debe recibir capacitación adecuada acerca de las tareas a realizar en la sección y las Normas de Bioseguridad.
20. Usar únicamente ropa limpia del laboratorio para ir a la cafetería y/o comedor.



21. El personal dedicado al procesamiento de muestras de esputo para tuberculosis, debe someterse a pruebas de tuberculina para detectar con prontitud el desarrollo de la enfermedad.
22. Usar gafas si fuera necesario durante los procedimientos de desinfección. Ejm. Uso de luz UV.
23. Sólo tendrán acceso al laboratorio: sección microbiología las personas a quienes se les han advertido los posibles peligros y reúnan los requisitos específicos para entrar a la sección.
24. Está determinadamente prohibido el ingreso de niños y ancianos porque están expuestos a una infección.
25. Se descontaminará los equipos o el equipo que necesita reparaciones o mantenimiento, para salir a área externa o in situ, y se colocará un rótulo para seguridad del personal de mantenimiento.
26. Se deberá colocar un rótulo o etiqueta en el equipo que ha sido descontaminado tendrá: fecha método de descontaminación y nombre del responsable que ejecutó el procedimiento (personal programado).

(Ver el cuadro de riesgo de infección de diversos procedimientos en la sección de microbiología). Anexo N° 4.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.1.2. ELIMINACIÓN DE MATERIALES CONTAMINADOS

Unidad Orgánica: DSMC – SAD – SLC – HVLH

Sección Microbiología

**Código N° 002**

Definición:

Procedimiento que se establece mediante una barrera mecánica entre el material contaminado, el ambiente y el personal.

Objetivo:

Realizar en forma adecuada y correcta la eliminación de materiales contaminados a fin de prevenir la contaminación con fluidos corporales potencialmente infectados; placas con crecimiento bacteriano y/o caldos.

Material

Bolsa de plástico impermeable para la eliminación de los desechos o sus envíos a descontaminación.

- Colocar la bolsa en un recipiente
- La bolsa debe llenarse no más de  $\frac{3}{4}$  de su capacidad.
- Cerrar la bolsa de manera que el personal la pueda manipular sin riesgo de contaminarse.
- Colocarlo en otra bolsa y etiquetarlo para luego autoclavar.

Nota

- Al descartar placas con crecimiento bacteriano colocarlo sobre una riñonera y las láminas predescontaminadas (lejía 5% o fenol 5%) colocarlos en un bocal; luego llevar a autoclavar.
- Después de autoclavar, enfriar el autoclave.
- Con ayuda de una espátula de madera retirar el gel de las placas y colocar en las bolsas de descarte.
- Lo mismo hacer con los tubos que contengan agares.
- Luego continuar con la limpieza del material (Ver Código N° 003).

Fecha:

Aprobación: \_\_\_\_\_

6.1.3. LIMPIEZA DEL MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SL-HVLH

**Código N° 003**

Sección Microbiología

Definición

Es una medida muy primordial para muchos ensayos que son sensibles a los siguientes contaminantes: iones, metales, detergentes y residuos orgánicos. El objetivo de muchos ensayos es investigar el efecto de ión metálico, una molécula química u otro agente químico en un proceso. Un material de plástico o vidrio contaminado, provocará la falta de precisión en la calidad de los datos.

Objetivo

Obtener un material perfectamente limpio, libre de contaminación siguiendo los procedimientos para cada problema común de limpieza.

Materiales

Cepillo, esponja, guantes domésticos, mandil de hule.

Reactivos

- Agua alcohólica ácida (alcohol 97°C + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O destilada)
- Lejía al 5% (hipoclorito de sodio).
- Jabón líquido diluido con agua caliente al 5% (Destran o Twin)
- Ácido clorhídrico al 5%
- Ácido Nítrico 20%
- Agua regia (HCl 1N y HNO<sub>3</sub> 1N en proporción de 3:1)
- EDTA<sup>-3M</sup>
- Solución de ácido crómico
- Solución alcohólica de hidróxido de sodio o potasio
- Sal de soda al 5%

Procedimiento

a) **Material de vidrio**

- 1.1. Deshechar el producto coloreado de los tubos en un recipiente que contenga lejía al 5%.
- 1.2. Inmediatamente sumergirlo en agua corriente.
- 1.3. Luego escurrir y dejar remojado en lejía al 5% preparado con agua caliente y rociar con los dedos un poco de detergente o jabón líquido al 5% (Twin o dextran); dejar reposar por 2 a 4 hrs.
- 1.4. También se puede usar sal de soda al 5% y hervir el material x 25 minutos.
- 1.5. Después de la operación 1.3 ó 1.4 cepillar y lavar con agua caliente en el caso de 1.4; primero enfriar, luego cepillar y lavar con agua caliente.
- 1.6. Luego escurrir y remojarlo en ácido clorhídrico al 5% x 15 minutos o ácido nítrico al 20% x 15' (minutos).
- 1.7. Escurrir y lavarlo con agua corriente.
- 1.8. Lavarlo el material (tubos de ensayo) escurrir y llevar a horno a 60°C o 100°C para su secado.

El lavado se hace con agua destilada tipo III (8 veces).

1.9. **Para un control de calidad de las operaciones de limpieza de vidrio se hará lo siguiente:**

- a) Seleccionar un tubo de ensayo y llenar con agua destilada de tipo III.
- b) Vaciar el contenido del tubo, para observar que se recubre de una película continua de agua; en caso que no suceda y se observe gotitas, quiere decir que el material no está limpio.
- c) La evaluación también puede realizarse enjuagando el tubo de ensayo con el agua destilada tipo III y se medirá el pH del

agua de enjuague. Si el procedimiento anterior indica pH alcalino, quiere decir que el tubo contiene restos de detergente.

- d) Otro punto de control es usar agua desionizada y colocar en un tubo de ensayo (que cumple todos los requisitos de limpieza) y agitar enérgicamente el agua, dispensar 2 gotas de bromosulfaltonia, mezclar y observar. Si aparece el color púrpura o rosado; quiere decir que la solución es alcalina debido a la presencia de residuos de detergente.
  - e) El material nuevo no debe ser usado sin previo tratamiento ya que es ligeramente alcalino; éste debe ser enjuagado con ácido clorhídrico al 5% (8 veces) y enjuagarse con agua destilada tipo III (8 veces).
  - f) Otros controles: descartar material de vidrio roto o dañado. Clasificar las pipetas según su capacidad de volumen.
- 1.10. Las pipetas TD (transferencia) debe inmediatamente remojar en agua corriente, lavarse en agua corriente (8 veces); luego remojar en acetona QP x 1 hora, luego escurrir y secar en horno de 20°C. Si está muy sucia colocarlo en solución sulfocrómica x 12 a 24 horas; sin olvidar que primero se lavará en agua corriente (8 veces).

**b) Material de plástico**

- 2.1. Lavar el material con agua y jabón líquido (Twin, Dextran)
- 2.2. Enjuagar con agua corriente abundante
- 2.3. Luego lavar con agua destilada tipo III (8 veces) Ver Anexo N° 6.
- 2.4. En ocasiones es necesario eliminar los compuestos que se adhieren a estos materiales de plástico; se usará alcohol de 97°G o cloruro de metilo QP.

- 2.5. Los residuos ácidos se eliminan con una solución de carbonato de sodio o bicarbonato de sodio.
- 2.6. Los residuos básicos se eliminan con una solución débilmente ácida.
- 2.7. No se debe usar productos abrasivos para su lavado.

### OBSERVACIONES GENERALES

#### PROBLEMAS COMUNES DE LIMPIEZA:

- **Grasas y aceites.** Generalmente un poco de detergente puede remover las grasas. Pero cuando se requiere limpieza rigurosa se puede usar solventes orgánicos como: acetona QP, alcoholes, cloruro de metilo. Pero si no es removido se puede usar solución alcohólica de potasio o sodio (hidróxido) para producir saponificación con ellos.
- **Materia orgánica.** Se usará solución de ácido crómico (solución sulfocrómica) se dejará el material de vidrio x 15' en esta solución dependiendo del uso que tenga. La otra alternativa es sumergir a ácido nítrico al 20% x 12 a 24 horas luego en H<sub>2</sub>O corriente cepillar (8 veces) y lavar. Finalmente enjuagar en agua destilada tipo III x 8 veces.
- **Trazas de contaminantes.** Para el material plástico que contenga trazas de ciertos metales; se usará HCl 1N y enjuagar con agua destilada 8 veces; y para mayor seguridad se usará ácido nítrico 1N y luego lavar con abundante agua destilada tipo III. Para el caso de Iones: Ca, Mg, Mng, Cu =: se recomienda usar agentes quelantes como EDTA al 10<sup>-3M</sup>, y luego enjuagar con agua destilada 8 veces.

Preparación de reactivos: (Ver Anexo N° 3)

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.1.4. CONTROL DE CENTRÍFUGA Y BAÑO MARÍA

Unidad Orgánica: DSMC–SLC–HVLH

**Código N° 004**

Sección Microbiología

Definición

Es un programa de control del instrumento y accesorios a fin de garantizar su buen funcionamiento y uso.

Objetivo

Cumplir y verificar en forma periódica y regular el programa de control ya que tiene una influencia directa en los resultados en química clínica.

Materiales

Tacómetro, velocímetro, equipos de medir temperatura, amperímetro, voltímetro.

\*Estos materiales lo trae el especialista especializado en control – calibración de equipos de laboratorio clínico.

Procedimiento

Normas y reglas que seguirá el especialista\*.

**CONSIDERACIONES GENERALES**

1. Limpieza diaria del equipo; tanto la parte exterior de estos como el lugar donde se ubican.
2. Verificación de los puntos de conexión de cada uno de ellos.
3. Limpiar la tapa de la centrífuga con agua oxigenada de 20 volúmenes si encontrase restos de muestras sanguíneas; luego con alcohol 97°G.
4. Tarar los tubos antes de llevar a la centrífuga para evitar roturas de estos.

5. Limpiar el baño María; retirando el agua destilada anterior, luego con una escobilla; retirar los restos de sarro del fondo y lados de ella.
6. Colocar en el baño María, después de su limpieza agua destilada hacer esta limpieza cada quince días.
7. Llamar al personal indicado para verificar revoluciones, rotor, temperatura de la centrifuga; al igual verificar el termostato, termómetro del baño María.
8. Registrar diariamente temperatura del baño María; con el uso de tarjetas.
9. Registrar mensualmente en tarjetas la centrifuga (Ver N° 7 C.G.).

Fecha:

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.1.5. CONTROL DE INCUBADORA – AUTOCLAVE

Unidad Orgánica: DSMC–SAD–SLC–HVLCH

**Código N° 005**

Sección Microbiología

Definición

Es un programa de control del instrumento y accesorios a fin de garantizar su buen funcionamiento y uso.

Objetivo

Cumplir y verificar en forma periódica y regular el programa de control ya que tiene, una influencia directa en los resultados en microbiología.

Materiales

Equipos de medir temperatura, amperímetro, voltímetro

\*Estos materiales lo trae el especialista especializado en control – calibración de equipos de laboratorio clínico.

Procedimiento

Normas y reglas que seguirá el especialista\*.

**CONSIDERACIONES GENERALES**

1. Limpieza diaria del equipo; tanto la parte exterior de estos como el lugar donde se ubican.
2. Verificación de los puntos de conexión de cada uno de ellos.
3. Controlar diariamente la temperatura de la incubadora antes de sacar las placas y/o tubos y anote en una hoja control.
4. Observar el termorregulador por cualquier alteración suposición preestablecida.



5. Colocar las muestras, placas y tubos en una posición segura.
6. Colocar un papel filtro humedecido con agua para conservar la humedad requerida.
7. Comunicar al Jefe de inmediato cuando el equipo falla en mantener el rango de temperatura aceptable.
8. Observar microscópicamente las placas petri la desecación.
9. Examinar record de temperatura y presión del autoclave.
10. Chequear el nivel de agua destilada de la olla del autoclave.
11. Chequear la válvula de seguridad (botón naranja).
12. Limpiar la parte interior del autoclave.
13. Limpiar el manómetro y sellos (clavos) del autoclave. (Ver Anexo N° 2)
14. Usar indicador de esterilización.
15. Usar tarjetas de registro: tiempo de uso, fecha, Temperatura °C, presión.

Fecha:

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

*[Firma]*



6.1.6. CONTROL DE CABINA SEGURIDAD

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 006**

Sección Microbiología

Definición:

Es un programa de control de instrumento accesorios a fin de garantizar su funcionamiento y uso.

Objetivo:

Cumplir y verificar en forma periódica y regular el programa de control ya que tiene una influencia directa con la Bioseguridad del operador (Barrera de contención contra agentes etiológicos).

Materiales:

Equipos de medir temperaturas, amperímetro, voltímetro, equipos de verificación de filtros y \*otros materiales que el especialista en calibración de equipos trae al laboratorio.

Procedimiento:

Normas y reglas que seguirá el especialista\*.

**CONSIDERACIONES GENERALES**

1. Apagar la lámpara UV (botón) antes de empezar a trabajar.
2. Levantar la pantalla hasta la marca indicada de color negro.
3. Verificar la luz interna de la cabina.
4. Encender (apretar tecla de encendido) y esperar 3 minutos.
5. Observar el apagado de luz durante los minutos que se está calentando el equipo.
6. Verificar la pantalla digital que indica el ingreso de aire y extracción de aire ( $l = 0.60$        $d = 0.40$        $T =$       )
7. Verificar la pantalla digital que indica aire estéril (Ver Anexo N° 6 )
8. Evitar el uso de mecheros dentro de la cabina.

9. Comprobar el sistema de alarma de funcionamiento.
10. Si hay derrame dentro de la cabina, limpie con un desinfectante: fenol al 5% con gasa manteniendo apagado la cabina.
11. Desinfectar la cabina antes y después del procedimiento.
12. La superficie de cabina (mesa) puede ser cultivada semanalmente para detectar contaminación.
13. Llevar un control de reemplazo de los filtros.
14. Llevar un control de uso de luz UV.
15. Llevar un control del tiempo de uso de la cabina.
16. No colocar papel kraff, espátula de madera, algodones dentro de la cabina porque se desprende partículas que dañan los filtros de purificación de aire.
17. Diariamente desinfectar con alcohol 70°G, las paredes de la cabina base, espalda de la venta o pantalla, frente de la pantalla, todo se hace con esponja: no usar algodón.
18. Semanalmente verificar y limpiar con alcohol 70°G debajo de las bandejas de la cámara.
19. Quincenalmente usar alcohol acetona para limpiar sobre accesorio de metal – acero luego limpiar con agua y detergente; secar y se tendrá la cabina excelente (Ver Anexo N° 6).

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.1.7. CONTROL DE REFRIGERADORAS Y MICROSCOPIO

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 007**

Sección Microbiología

Definición:

Programa de control de equipos y accesorios a fin de garantizar su funcionamiento y uso.

Objetivo:

Cumplir y verificar en forma periódica y regular el programa de control ya que tiene una influencia directa en los procedimientos e identificación del agente etiológico.

Materiales:

Equipo de medir temperaturas de refrigeración; y otros traídos por el especialista en calibración de microscopios.

Procedimiento:

Normas y reglas que seguirá el especialista.

**CONSIDERACIONES GENERALES**

1. Control diario de temperatura de la refrigeradora.
2. Colocar las placas petri en posición invertida con tapa hacia abajo.
3. Mantener la temperatura entre 4 – 8°C.
4. Verificar que no haya escarcha.
5. No colocar medios de cultivo aún calientes.
6. Evitar de abrir con frecuencia la puerta de la refrigeradora.
7. Llevar un registro de problemas de funcionamiento, causa y soluciones.
8. Descongelar semanalmente (cuando sea necesario) observar hielo.
9. Limpiar el aceite de objetivos, condensador, etc. del microscopio.
10. Apagar la fuente de luz.
11. Colocar el cobertor contra el polvo.
12. Limpiar el ocular, condensador, diafragma con líquido de limpieza de lentes.
13. Limpiar el ocular y ajuste del sistema óptico
14. Limpiar y ajuste del sistema lumínico
15. Limpiar y lubricar el sistema mecánico.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.1.8. CONTROL DE BALANZA ANALITICA

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 008**

Sección Microbiología

Definición:

Es un programa de control de instrumento a fin de garantizar su funcionamiento y uso.

Objetivo:

Cumplir y verificar en forma periódica y regular el programa de control ya que tiene una influencia directa con las medidas de peso de los medios de cultivo antes de prepararlos.

Materiales:

Equipo de medir como: amperímetros, voltímetros y otros que el especialista \* de calibración de balanzas trae.

Procedimiento:

Normas y reglas que debe cumplir el especialista\* .

**CONSIDERACIONES GENERALES**

1. Verificar que el plato no contenga restos de medios de cultivo (polvo, gránulos, etc.)
2. Verificar punto eléctrico de funcionamiento.
3. Verificar la pantalla digital que indica que el equipo está tarado.
4. Calibrar el equipo, usando la medida que solicita el equipo (peso de 100 grs.).
5. Cada vez que se use para pesar los medios no mover el plato, si no se descalibra.
6. Cada vez que se termine de pesar volver a tarar a cero.
7. No mover ningún equipo, o abrir cajones de la mesa donde se ubique la balanza; porque se descalibra.
8. Cubrir el equipo con forros contra el polvo.
9. Usar sobre el plato papel cebolla o de mantequilla para pesar los medios.
10. Si hay un movimiento extraño en mesa de trabajo volver a proceder (Ver Anexo N° 7).

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

## 6.2. MEDIOS DE CULTIVO

### 6.2.1. MEDIOS SÓLIDOS

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 009**

Sección Microbiología

Definición:

Son sustancias deshidratadas, higroscópicas de presentación en polvo o granulados que al adicionar agua destilada se mezclen y se van disolviendo con ayuda del calentamiento, se autoclavan, a algunos se le agrega suplementos, antibióticos, otras nutrientes, luego se reparte en placas estériles y se espera hasta que solidifiquen.

Objetivo:

Aislamiento de una serie de microorganismos.

Favorecer el crecimiento bacteriano por los suplementos y compuestos existente en el medio.

Clasificación:

a) Nutritivos

Agar Columbia

Agar Mueller Hinton

Agar sangre

Agar Brucella

Agar chocolate

Agar cerebro corazón

Agar TSA

b) Diferencial – selectivos:

Agar Mc Conkey

Agar TCBS

Agar SS

Agar sangre telurito

Agar XLD

Agar Mc Conkey – Sorbitol

Agar bismuto sulfite

Agar Manitol salado

c) Selectivos

Agar Thayer Martin

- Medio selectivo para Campylobacter
- Medio selectivo para bordetella
- Medio selectivo para legionella BCYE
- Medio selectivo para Micoplasma pneumoniae SP<sub>4</sub>
- Medio difásico para Micoplasma pneumoniae
- Medio selectivo para Micoplasma hominis
- Urea plasma urea lyticum

Materiales:

Algodón, gasas, papel kraff, fiolas o erlemeyer, trípode, parrilla de Asbesto, agua destilada estéril, balanza digital, papel cebolla, bagueta de vidrio.

Procedimiento:

(Ver anexos.)

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

*[Firma]*



6.2.2. MEDIOS LÍQUIDOS

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 010**

Sección Microbiología

Definición:

Son medios líquidos que en su composición no tienen agar, usados para el enriquecimiento de producción de bacterias, para inocular a otros medios, detectar crecimiento en diferentes pH, como medio basal para preparar otros, etc.

Objetivo:

Recuperar bacterias específicas y diferenciar una de otras.

Clasificación:

a) Caldos Nutritivos:

- |                                |                                |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Caldo hemocultivo aerobio      | Caldo Soya Trypticasa          |
| Caldo Infusion cerebro corazón | Caldo Nutritivo Mueller Hinton |
| Caldo Brucella                 | Caldo Peptonado                |
| Caldo Columbia                 | Caldo Soya Trypticasa          |
|                                | Caldo Triptosa Fosfato         |

b) Caldos diferenciales:

- Caldo Base Fermentación Azúcares (Arabinosa 102)
- Decarboxilasa Base Moeller (Lisina-Arginina- Ornitina)
- Caldo Malonato de sodio
- Caldo NaCl 6.5% (con glucosa e indicador púrpura bromocresol)
- Caldo urea (con fenoltaleína)
- Caldo nitrato

c) Caldos de enriquecimiento:

- |                |                    |
|----------------|--------------------|
| Caldo SS       | Caldo Selenito F   |
| Agua Peptonada | Caldo Tetrionato   |
| Alcalina       | Caldo tioglicolato |

Materiales: algodón, gasas, papel kraff, fiolas o erlemeyer, trípode, parrilla de asbesto, agua destilada estéril, balanza digital, papel cebolla, bagueta de vidrio.

Procedimiento:

(Ver anexos)

Fecha:

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.2.3. MEDIOS DE TRANSPORTE

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 011**

Sección Microbiología

Definición:

Son medios semisólidos que por razones de tiempo o distancia se usan porque no se puede realizar la siembra inmediata de la muestra.

Objetivo:

Conservar casi invariablemente la posible flora presente en la muestra a examinar.

Tenemos:

Amies (con carbón)	Stuard
Amies (sin carbón)	Cary-Blair

Materiales:

Algodón, gasa, papel kraff	Balanza digital
Fiolas o Erlenmeyer	Papel cebolla
Tripode, parrilla de asbesto	Bagueta de vidrio
Agua destilada estéril	

Procedimiento:

(Ver Anexos)

Fecha:

Aprobación: \_\_\_\_\_

6.2.4. MEDIOS DIFERENCIALES

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 012**

Sección Microbiología

Definición:

Son medios que contienen uno o varios sustratos específicos, algunas veces con indicador de pH "in situ" o elaboración de metabolitos evidenciales mediante el uso de reactivos.

Objetivo:

Usar los medios de diferenciación bioquímica para identificar las bacterias.

Tenemos:

- |  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| TSI: Triple sugar iron                     | Movilidad nitrato                   |
| LIA: Lisine agar iron                      | Bilis esculina                      |
| MIO: Movilidad, Indol, Ornitina            | Gelatina (reactivo de Frazier)      |
| SIM: Hidrogeno sulfurado, Indol, movilidad | DNasa (indicador azul de toluidina) |
| Citrato: uso del carbono                   | DNasa (agar TSA + ADN)              |
| Urea de Christensen                        |                                     |
| Of (Hugh-Leifson)                          |                                     |

Materiales:

Algodón, gasas, papel kraff, fiolas o erlemeyer, trípode, parrilla de asbesto, agua destilada estéril balanza digital, papel cebolla, bagueta de vidrio.

Procedimientos:

(Ver anexos)

Fecha:

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.2.5. OTRAS PRUEBAS

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 013**

Sección Microbiología

Definición:

Son pruebas de diferenciación bioquímica que evidencian la capacidad de la bacteria de degradar substratos, evidenciar enzimas propias presentes en estos medios y diferenciar su propia familia.

Objetivo:

Caracterizar definitivamente a las bacterias

Tenemos:

Oxidasa	Hipurato de sodio
Catalasa	Rojo de Metilo
Noboviocina	$\beta$ -galactosidasa
Optoquina	Voges - Proskauer
Bacitracina	$\beta$ -Lactamasa
ONPG	Factores X – V
Reacc. Indol	Test de Camp
Tinción Gram	Tinción Zielh Nellseen
Tinción Vago	Tinción de cápsulas
Polimixina B	Tinción de Azul de Metileno

Material y

Procedimientos

(Ver Anexo)

Fecha:

Aprobación: \_\_\_\_\_

### 6.3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

#### 6.3.1. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE PARA CULTIVO

Unidad Orgánica: DSMC–SAD–SLC–HVLH

**Código N° 014**

Sección Microbiología

Definición:

Procedimiento necesario que contribuya al diagnóstico de bacteriemia y pronóstico de ciertas infecciones.

Objetivo:

Aislar microorganismos presentes en sangre, cumpliendo las características y condiciones específicas.

#### CONDICIONES ESPECÍFICAS

- Momento óptimo de obtención de la muestra para hemocultivo es justo antes del pico más alto de fiebre.
- Hay momentos que la premisa anterior no se cumple; las muestras se pueden tomar de acuerdo al caso; por ejm.:
  - a) Bacteremias Continuas: Ejm. Endocarditis “En cualquier momento”.
  - b) Bacteremias Intermitente: Ejm. Brucelosis “una hora antes del pico febril”
- Número de cultivo de sangre en adultos:
  - a) En sepsis: tomar 2 a 3 muestras de lugares diferentes en un lapso de 10’.
  - b) En endocarditis aguda: tomar 3 muestras de lugares diferentes en un lapso de 1 – 2 h.
  - c) En endocarditis subagudo: tomar 3 muestras de lugares diferentes al menos dentro de 15’ (minutos), con intervalos en cada muestra.
  - d) En fiebre de origen desconocido: tomar 2 a 3 muestras con diferencia de 1 hora.

- e) Si un cultivo es negativo a las 24 hrs., obtener 2 a 3 muestras.
- Obtención de muestras de sangre mediante el uso de jeringa:
    - a) Asépticamente desinfectar el sitio de la venopunción con alcohol etílico al 70% y luego con una preparación de yodo en círculos concéntricos hacia fuera del sitio elegido. Espere que el yodo seque y realice la punción sin palpar de nuevo.
    - b) La proporción entre el volumen de sangre obtenido y el volumen del caldo de cultivo debe estar en una relación de 1:5 – 1:10.
    - c) El volumen de sangre dependerá de la edad del paciente por cada venopunción.

Se recomienda:

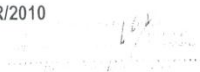
Adultos	:	10 – 30 ml (mililitros)
Niños	:	1 – 5 ml
Lactantes	:	1 – 2 ml
Neonato	:	0.5 – 1 ml

- Inoculación de la muestra de sangre al medio de cultivo.
  - a) Usar medio bifásico o monofásico
  - b) Desinfectar el diafragma del frasco de hemocultivo con alcohol de 70% o alcohol yodado.
  - c) Inocular la muestra de sangre al frasco con medio de cultivo a través del diafragma; debe realizarse inmediatamente antes que se coagule.
  - d) Mezclar el contenido del frasco inclinando 2 a 3 veces; en caso que se use medio bifásico, bañar con la muestra la fase sólida.
  - e) Descartar la aguja y depositar en un contenedor de agujas.
  - f) Limpiar la tapa del frasco, rotular, fechar, transportar de inmediato al laboratorio.

Fecha:

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ORINA (UROCULTIVO)

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 015**

Sección Microbiología

Definición:

Procedimiento que se aplica en la obtención de muestras de orina de pacientes para el diagnóstico de infecciones urinarias.

Objetivo:

Describir los diferentes pasos de obtención de muestras de orina, ya sea por chorro medio, por aspiración por catéter vesical, y por aspiración suprapúbica.

**CONDICIONES GENERALES**

- La orina es un excelente medio de cultivo para la proliferación bacteriana, por esta razón, la muestra debe ser procesada dentro de las dos (2) hrs. después de haber sido obtenida, o debe refrigerarse a 4°C (máximo 2 hrs.) hasta su procesamiento.
- Generalmente el desarrollo de 2 tipos de colonias (pacientes sin sonda vesical) indica: contaminación y demora en el proceso de siembra.

**A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES MUJERES HOSPITALIZADAS**

- Materiales y Equipos
  - o Guantes estériles
  - o Gasa estéril de 4" x 4" estéril (5 unidades)
  - o Jabón
  - o Agua tibia estéril
  - o Frasco estéril de tapa rosca, boca ancha
- Procedimiento
  - o Mantener la privacidad del paciente
  - o Rotular el frasco con el nombre de la paciente, fecha de obtención, hora y el procedimiento a utilizar en la obtención de la muestra.

- Lavarse las manos con agua y jabón, secarse con papel toalla y luego usar guantes.
- Preparar una pieza de gasa con agua más jabón.
- Preparar 2 piezas de gasa con agua tibia estéril.
- Empezar la limpieza de Iso genitales externos con gasa (agua + jabón) x 3 veces.
- Enjuagar los genitales externos con gasa (agua tibia estéril). Repetir este procedimiento desveces.
- Finalmente secar el área de adelante hacia atrás.
- Separar los labios sosteniendo ambos (genitales externos) lados de estos hacia fuera con una sola mano; mientras orina la paciente, luego del chorro inicial; colocar el frasco estéril para colectar con chorro medio.
- Transportar al laboratorio de inmediato (la muestra dura solamente 2 horas) en el ambiente.

#### B. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA EN PACIENTES HOMBRE

- Materiales y equipos:
  - Guantes estériles
  - Gasa estéril de 4" x 4" estéril (7 unidades)
  - Jabón
  - Agua tibia estéril
  - Frasco estéril de tapa rosca, boca ancha.
- Procedimientos
  - Mantener la privacidad del paciente.
  - Lavarse las manos con agua y jabón, secarse con papel toalla, colocarse los guantes.
  - Tomar una gasa estéril y agregar jabón + agua, con ello limpiar el genital externamente, pasada de adelante hacia atrás.
  - Retraer el prepucio y cavar la cabeza del pene con la ayuda de una gasa (jabón + agua) repetir este proceso 3 veces.



- Luego lavar con agua estéril (tibia) con la ayuda de una gasa x 2 veces; luego secar con gasa estéril.
- Pedir al paciente que mantenga el prepucio retirado con la ayuda de una gasa estéril; e inicie la micción en un recipiente (orina para descartar).
- Colocar el frasco estéril, luego de la micción inicial para tomar el chorro medio.
- Luego tapar el frasco y llevar de inmediato al laboratorio (conservar en el ambiente solo 2 hrs.).

### C. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ORINA POR ASPIRACIÓN DE CATÉTER VESICAL

- Material
  - Guantes estéril
  - Jeringa descartable estéril
  - Aguja descartable estéril N° 21
  - Tubo o frasco estéril para la muestra
  - Alcohol 70%
- Procedimiento
  - Rotular el frasco con el nombre del paciente, fecha, hora y procedimiento a usar para obtener la muestra.
  - Desinfectar con alcohol 70% el extremo proximal del catéter (lo más cerca al punto de inserción), donde se realizará la punción.
  - Realizar una punción en el área desinfectada y con la jeringa obtener la muestra: 5 ml a 10 ml de orina.
  - Vaciar la orina en un tubo estéril o frasco estéril evitando que el cuello de jeringa toque la boca del frasco.
  - Tapar herméticamente el tubo o frasco.
  - Llevar inmediatamente al servicio (la muestra dura 2 hrs. en el medio ambiente).



**D. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ORINA POR ASPIRACIÓN SUPRAPÚBICA**

- Condiciones Generales
  - o Ocasionalmente puede ser necesaria sobre todo cuando se trata de niños.
  - o El procedimiento es efectuado por el médico pediatra asegurando que el paciente tenga la vejiga llena; realizando una punción directa de la vejiga a través de la pared abdominal con aguja y jeringa estéril.
  - o Luego seguir los procedimientos mencionados en líneas atrás.
- Procedimiento
  - o Rotular el frasco con el nombre del paciente, fecha de obtención de la muestra, hora y el procedimiento a usar para obtener la muestra.
  - o Colocar en el recipiente estéril la orina obtenida por aspiración.
  - o Tapar el recipiente.
  - o Llevar la muestra inmediatamente al laboratorio para su proceso (dura dos horas en temperatura ambiente).
  - o En niños para obtener del chorro medio es mejor estar pendiente del momento que el niño tenga deseos de miccionar.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.3.3. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE HERIDA, HERIDA OPERATORIA, ÚLCERAS

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 016**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento que se aplica en la obtención de muestra de herida operatoria de los pacientes para el diagnóstico de infección por aerobios.

Objetivo:

Describir las diferentes etapas de obtención de muestra de herida operatoria para la investigación microbiológica.

Materiales:

- Guantes de látex estéril
- Solución salina estéril
- Jabón
- Gasa estéril
- Mascarillas
- Hisopos estériles de algodón
- Medio de transporte de Stuart o Amies con carbón.
- Láminas portaobjeto
- Tubos estéril.

Procedimientos:

- Colocarse los guantes, previamente lavado de manos con agua jabón.
- 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.
- Separar los bordes de la herida muy suavemente con el pulgar e índice de la mano.
- Con la otra mano cuidando de no rozar los bordes cutáneos, introducir la punta del hisopo, en la profundidad de la herida, de forma rotativa y avanzando hacia fuera sin tocar la herida.

Obtener dos muestras:

- a) Uno va al medio Stuart o Amies con carbón
- b) La 2ª va para realizar una coloración Gram (realizar una extensión muy fino).
- c) En el medio de transporte se puede mantener 24 hrs. al medio ambiente.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

*[Handwritten signature]*



6.3.4. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ABSCESO POR ASPIRACIÓN CON AGUJA

Unidad Orgánica: DSMC–SAD–SLC–HVLH

**Código N°017**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento que se aplica en la obtención de muestra de absceso de cualquier parte del cuerpo humano por aspiración con aguja.

Objetivo:

Describir las etapas para obtener muestras de abscesos para la investigación microbiológica.

Materiales:

- Guantes estériles
- Jeringa estéril
- Aguja adecuada N° 18 ó 20
- Solución salina estéril
- Jabón
- Gasa estéril
- Tubo estéril
- Medio de transporte (Stuart o Amies con carbón)
- Alcohol 70%.

Procedimiento:

- Lavarse las manos con agua + jabón y colocarse los guantes estériles.
- Realizar una buena limpieza de la superficie con agua y jabón
- Limpiar de adentro hacia fuera en forma concéntrica.
- Desinfectar con alcohol 70% o yodo povidona.
- Introducir la aguja a través de la piel y/o pared del absceso y aspirar aproximadamente 1 ml. de material purulento con la jeringa.

- Colocar la muestra en un tubo estéril.
- Si el transporte se demora de 20 a 30 minutos colocarlo en medio de Stuart o Amies con carbón.
- En el medio de transporte, la muestra dura hasta 24 hrs. en el medio ambiente.

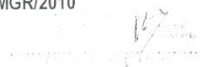
**Nota:** Si hubiera quemaduras:

- Limpiar la zona y retirar tejido muerto, antes de la obtención de la muestra (puede ser un hisopado del exudado o una biopsia).
- Las muestras debe llevarse en gasa estéril o en un envase de tapa rosca estéril.

Fecha:

Aprobación: \_\_\_\_\_

TM. JMGR/2010



6.3.5. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE VÍAS RESPIRATORIAS ALTAS

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 018**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento por el cual se aplica en las etapas de obtención de muestras para el diagnóstico de infección de vías respiratorias altas.

Objetivo:

Describir las etapas del procedimiento para realizar el diagnóstico microbiológico mediante cultivos.

Condiciones específicas

Las muestras deberán ser obtenidas por el personal especializado siguiendo los procedimientos normativos del SAD.

Materiales:

- Recipiente estéril o tubo estéril
- Tubo estéril con 1 ml de suero fisiológico estéril o caldo TSA, BHI.
- Láminas portaobjetos
- Guantes estériles
- Máscaras N95
- Baja lengua estéril
- Hisopo de dragón o algodón
- Hisopo de alambre de cromo o acero inoxidable y la punta está cubierta por algodón\* o alginato de calcio.

Procedimiento:

- El paciente debe estar sentado frente a una fuente luminosa.
- Lavarse las manos con agua y jabón; colocarse guantes.

- Mantener la lengua deprimida mediante el uso de un baja lengua con la mano izquierda.
- Frotar el hisopo sobre cada área amigdalina y faringe posterior y cualquier observación de exudado de otra zona inflamada.
- No contaminar el hisopo tocando la lengua y los labios.
- Colocar el hisopo en tubo estéril.
- Tomar una segunda muestra y hacer un frotis, llevar de inmediato al laboratorio.
- Si la muestra no se puede procesar en un plazo de 4 hrs. colocar en medio de transporte Amies o el de Stuart.

\* Para el diagnóstico de tos ferina, difteria (muestra nasofaringe).

- Obtener la muestra usando el hisopo de alambre de cromo, y pasar muy suavemente a través de una fosa nasal hasta la nasofaringe.
- Emulsionar el material del hisopo en 0.25 – 0.50 ml. de solución de casaminoácidos (CAS) estéril, pH 7,2 (duración 2 horas) o medio Stuart y enviar al laboratorio referencial.
- No refrigerar la muestra.

Fecha:

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.3.6. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 019**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento por el cual se aplica para el diagnóstico en las etapas de obtención de muestras de infección del Tracto Respiratorio Inferior (esputo).

Objetivo:

Describir las etapas del procedimiento para realizar el diagnóstico microbiológico mediante cultivos.

Condiciones específicas

- El material debe ser purulento o mucopurulento.
- Debe recolectarse antes del tratamiento antimicrobiano.
- Debe obtenerse al despertar si es posible.
- Refrigerar 1 a 3 horas si el cultivo no es inmediato.
- hacer una coloración gram para determinar si hay contaminación con flora de vías respiratorias alta, antes del proceso de cultivo.
- Si el esputo se considera no satisfactorio se le coloca en refrigeración y se solicita nueva muestra.
- Se considera muestra aceptable si se encuentra dentro del puntaje de esputo: > 25 PMN y células: <25, <10 (Barlett y col.).
- Para el aislamiento de *Mycoplasma pneumoniae* debe recogerse esputo en recipiente estéril. Hisopos de garganta colocados en 3 ml. de medio de transporte (albúmina bovina 0.5% en caldo TSA), se puede congelar a - 70°C.



Materiales:

- o Recipiente estéril o tubo estéril
- o Tubo estéril de suero fisiológico o caldo TSA.
- o Hisopos, vaso descartable, nebulizador

Procedimiento:

a) Espujo por expectoración

- o Haga que el paciente se enjuague la boca con la ayuda de un vaso con agua antes de expectorar para remover la flora superficial oral.
- o Si tiene dentadura postiza se la debe quitar.
- o Instruir al paciente para que tosa con fuerza y profundo.
- o Depositarlo directamente al recipiente estéril.
- o No coleccionar saliva y secreción post nasal.
- o Registrar nombre de los microorganismos de interés: bacteria, hongo, micobacteria.
- o Para el diagnóstico de BK, coleccionar dos muestras seguidas (días consecutivos).

b) Espujo inducido:

- o Haga que el paciente se enjuague la boca
- o Con ayuda de un nebulizador, hacer que el paciente inhale aerosol de solución salina al 3%, 10%.
- o Coleccionar en un envase estéril.

Fecha:

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.3.7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TRACTO GENITAL

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 020**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento que define las diferentes etapas de obtención de muestras del tracto genital.

Objetivo:

Describir los procedimientos en cada una de las áreas genitales; tanto femenino como masculino para luego realizar el diagnóstico microbiológico mediante cultivos de presuntas infecciones de transmisión sexual.

A. Conducto Endocervical

o Materiales:

- Espéculos, agua caliente, pinzas con uñas, algodón (torunda estéril), hisopo estéril, alginato de calcio, dragón, algodón, tubos estériles, láminas portaobjeto, guantes estériles.

o Procedimiento

- Humedecer el espéculo con agua caliente, no usar lubricante.
- Quitar el exceso de mucus cervical, con la ayuda de una torunda de algodón sujeta con pinzas.
- Tomar un hisopo estéril e insertar al conducto endocervical, moverlo de un lado a otro, dejar pasar 10 – 30 segundos para que se absorba los microorganismos (repetir dos veces).
- Colocar en un tubo estéril el primer hisopo y el segundo hacer un frotis.

B. Hisopado uretral

o Materiales:

- Gasa estéril 4" x 4" 3 unds.
- Hisopo estéril de alginato de calcio, dragón, algodón
- Tubo estéril, guantes estériles.

o Procedimiento:

- El paciente no deberá miccionar 2 horas antes de la toma de muestra.
- Limpiar externamente si presenta secreción abundante con la ayuda de la gasa estéril (jabón + agua estéril).
- Exprimir la uretra peneana, o masajear la uretra femenina.
- Tomar la muestra con hisopo de alginato de calcio a 1 – 2 cm. del meato uretral.
- Rotar por 30" en la uretra, si hay secreción abundante colocar sobre el hisopo.
- Hacer el anterior procedimiento por 2 veces.
- Colocar en un tubo estéril y hacer un frotis con el 2º hisopo.

Nota: De preferencia inocular directo en un medio de cultivo.

C. Hisopado rectal

o Materiales:

- Anoscopio
- Gasa estéril 6 unds.
- Guantes estériles
- Hisopo estéril (dragón)

o Procedimiento

- Limpiar la zona canal si hay secreción anal, heces o sangrado con la ayuda de gasa estéril.

6.3.7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TRACTO GENITAL

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 020**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento que define las diferentes etapas de obtención de muestras del tracto genital.

Objetivo:

Describir los procedimientos en cada una de las áreas genitales; tanto femenino como masculino para luego realizar el diagnóstico microbiológico mediante cultivos de presuntas infecciones de transmisión sexual.

A. Conducto Endocervical

o Materiales:

- Espéculos, agua caliente, pinzas con uñas, algodón (torunda estéril), hisopo estéril, alginato de calcio, dragón, algodón, tubos estériles, láminas portaobjeto, guantes estériles.

o Procedimiento

- Humedecer el espéculo con agua caliente, no usar lubricante.
- Quitar el exceso de mucus cervical, con la ayuda de una torunda de algodón sujeta con pinzas.
- Tomar un hisopo estéril e insertar al conducto endocervical, moverlo de un lado a otro, dejar pasar 10 – 30 segundos para que se absorba los microorganismos (repetir dos veces).
- Colocar en un tubo estéril el primer hisopo y el segundo hacer un frotis.

- Introducir el hisopo de dragón introduciendo 2 – 3 cm., en el recto.
- Rotar 30° en las paredes del recto en sentido horario.
- Si se observa abundante contaminación fecal, eliminar el hisopo y tomar la muestra con otro hisopo.
- Extender en el medio de cultivo.
- Antes de eliminar la muestra tomar otra muestra y hacer un frotis.

D. Hisopado prostático:

○ Materiales:

- Jabón
- Agua estéril
- Gasa estéril
- Guantes estéril
- Hisopos estériles
- Tubos estériles

○ Procedimiento:

- Colectar la muestra al menos 1 hora después que el paciente a orinado.
- Limpiar el meato urinario con jabón antiséptico y agua estéril.
- Masajear la próstata a través del recto.
- Coleccionar el fluido con un hisopo estéril y colocar en un tubo estéril.

Nota: Después del masaje prostático es muy útil el cultivo de orina para aislar gonococos.

E. Otras Localizaciones

1. Hisopado faríngeo

- Tomar las muestras con dos hisopos de algodón o dracón introduciendo el hisopo hasta las criptas amigdalina, evitar chocar con la lengua o paladar; sujetar con baja lengua.
  - Rotar los hisopos por 30".
  - Extender en medio de cultivo.
  - Hacer un frotis (con otro hisopo tomar nueva muestra).
2. Hisopado de conjuntiva
- Limpiar con gasa y SF. estéril la zona adyacente al ojo.
  - Suavemente con un hisopo de alginato de calcio, tomar directamente la muestra de la secreción conjuntival.
  - Extender sobre medio de cultivo.
  - Hacer un frotis (con otro hisopo tomar nueva muestra).
3. En caso de enfermedad pélvica inflamatoria se obtendrán las muestras por laparoscopia.
4. Si se sospecha enfermedad de transmisión sexual diseminada por ejm. Gonorrea; tomar todas las muestras del tracto genital y de otras localizaciones.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

6.3.8. OBTENCIÓN DE MUESTRAS: HECES

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 021**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento que se aplica a la obtención de heces para la investigación de agentes patógenos / parásitos causantes de infecciones en el tracto digestivo.

Objetivo:

Describir cada paso los procedimientos para luego hacer el estudio microbiológico mediante cultivo o exámenes directos.

Condiciones generales

- No cultivar la muestra si es dura o bien formada
- No se recomienda el uso de Culturette, salvo para infantes y pacientes con diarrea activa. Si lo usa recolectar 2 grs. de muestra.
- Para estudio de Rotavirus y Clostridium difficile, enviar solo muestra diarreica no use hisopo.
- Obtener la muestra antes de la antibioticoterapia
- Usar recipiente estéril de boca ancha y cierre hermético.

Materiales:

- Tubos estériles 2 unds.
- Medio de transporte: Cary Blair
- Lámina portaobjeto 3 unds.

Procedimiento:

- Obtener la muestra mediante un hisopado, haciendo rotar el mismo sobre las paredes del recto, se usa para hacer frotices para luego colorear con azul de metileno y gram. Luego se observará en frasco.

- Con el segundo hisopo se obtendrá la muestra y se colocará en el medio de transporte: Cory Blair; pero antes el hisopo se sumergirá en el medio luego introducir a la ampolla rectal para obtener la muestra, con esto el posible microorganismo que afecta el sistema digestivo del paciente permanezca viable hasta su sembrado.
- Se sugiere que se transporte al laboratorio de inmediato; antes de las 2 horas.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_





#### 6.4. ENVÍO Y TRANSPORTE DE MUESTRA

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 022**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento que tiene requisitos y condiciones necesarios para enviar y transportar muestras.

Objetivo:

Describir las diferentes etapas de transporte y conservación de las muestras hacia su destino específico.

Condiciones:

- Debe ser mantenida lo más cerca posible a su estado original, debiendo evitar temperaturas extremas o desecamientos excesivos. Por lo general debe enviarse de 1 a 4 ml. dentro de 15 a 30 minutos.
- En el caso de líquido extrapulmonar debe de enviarse de inmediato pero si el lugar es lejano se puede guardar en refrigeración pero sólo 24 horas.
- En el caso de muestras sanguíneas, inmediatamente separar por centrifugación y colocar el producto en un criovial de plástico.
- Las muestras sanguíneas que se envían a otro laboratorio, verificar el anticoagulante para conservar la sangre anticoagulada. Por ejm. para pruebas de hemostasia.

Procedimiento:

- Para su transporte al laboratorio se colocan las muestras en un envase secundario, el cual puede ser de material plástico u otro resistente a roturas o filtraciones.
- Todas las muestras deben enviarse al laboratorio lo más pronto posible dentro de las dos horas de haber sido obtenidas.
- Si no es posible enviar en los medios de transporte que se recomiendan.
- Por lo general no se almacenan las muestras por más de 24 horas.
- Antes de rechazar una muestra debido a una información inapropiada o incompleta se debe establecer contacto con el responsable para efectuar las correcciones necesarias para completar la información.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



6.4.1. CRITERIOS PARA RECHAZAR UNA MUESTRA

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 023**

Sección Microbiología

Definición:

Son elementos de suma importancia cuando se va a enviar una muestra a evaluar.

Objetivo:

Recibir muestras debidamente colectadas y transportadas hacia el laboratorio.

Nota: Estas muestras deben representar la causa probable de infección de lo contrario el procesamiento y reporte de muestras no adecuada puede proveer información equivocada la cual puede llevar a un mal diagnóstico y por consiguiente fallas en el tratamiento que pueden poner en peligro la vida del paciente.

Causales:

- a) Muestras no rotuladas o sin identificación
- b) Discrepancia en la identificación del paciente y la muestra
- c) Envase inapropiado o medio de transporte inadecuado
- d) Demora prolongada en enviar la muestra al laboratorio
- e) Duplicación de muestra del mismo paciente dentro de las 24 horas **excepto sangre.**
- f) No indicar tipo de muestra o procedencia
- g) No indicar tipo de examen en la solicitud
- h) Muestra con preservativos
- i) Muestra derramada o roturas del envase
- j) Orina colectada de la bolsa de catéter

- k) Saliva
  - l) Muestra seca en el hisopo
  - m) Una sola muestra de hisopado con varias órdenes
  - n) Contaminación obvia de la muestra
  - o) Volumen inadecuado.
- 
- En casos de muestras rechazadas el personal de laboratorio debe explicar al médico las razones y observaciones en la ficha de solicitud de diagnóstico correspondiente.
  - En caso de muestras que no se pueden obtener nuevamente la interpretación de la coloración gram debe ser revisado cuidadosamente.
  - Es importante el examen microscópico del material clínico, ya que permite conocer no sólo la calidad de la muestra, sino también la presencia de microorganismos, lo que proporciona suficiente información para un diagnóstico presuntivo inmediato.

Fecha:

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



## 6.5. PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 024**

Sección Microbiología

- Las bacterias para su desarrollo necesitan sustancias nutritivas cuyos componentes básicos deben satisfacer las mínimas exigencias nutricionales y condiciones de atmósfera, pH, temperatura.
- La elección de los medios de cultivo se realiza en función a la localización de las infecciones y las bacterias a investigar.
- Los errores cometidos durante este paso puede invalidar la lectura e interpretación de los cultivos.

### 6.5.1. SIEMBRA DE MUESTRA DE ORINA

Definición:

Es un procedimiento de cultivo primario de una muestra de orina para la investigación bacteriológica de infecciones del tracto urinario.

Objetivo:

Describir paso a paso los procedimientos de siembra.

Material y Equipo:

- Asa calibrada de platino de 0.001, 0.01 ml (Ver Anexo N° 8)
- Estufa de 35°C – 37°C
- Mechero Bunsen o Cabina de Seguridad
- Contenedor de material contaminado
- Pinza estéril, guantes estériles
- Propipeta
- Médios de cultivo: Placas com agar sangre de carnero (AS)  
Placas com agar Mac Conkey (McC)  
Placas com agar CASO (es opcional)
- Papel toalla

Procedimiento:

- Mantener las muestras en refrigeración (4°C) hasta su procesamiento por cultivo.
- Los cultivos deben realizarse en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero Bunsen.
- Las placas deben ser McC y AS, que se utilizarán en el urocultivo, deben estar a temperatura ambiente.
- Nota: Si usa caso agar, tener en cuenta que su uso es de doble identificación, o sea crece gram (-) y gram (+).
- Esterilizar el asa de siembra flameándola en el mechero Bunsen hasta que se ponga rojo vivo.
- Dejar enfriar el asa, contar hasta 20.
- Tomar el frasco con la muestra de orina, homogenizar sin tocar la tapa, cubrir la tapa y colocarla sobre un papel toalla; flamear la tapa con mechero Bunsen, si no tiene cabina de bioseguridad.
- Tomar la muestra de orina con el asa de siembra estéril introduciéndola y sacándola del frasco en forma vertical.
- Tapar el frasco con la muestra.
- Inocular en el centro la placa AS o Agar Caso a partir del cual se extiende la muestra, hacia delante y hacia atrás (Ver Anexo N° 9).
- Luego, sin quemar el asa, el inóculo se disemina uniformemente con trazos perpendiculares a la siembra inicial en toda la placa.
- Proceder de la misma forma con el agar McC.
- Esterilizar el asa de siembra en el mechero.
- Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- Incubar la placa AS y/o Caso y Mc Conkey a 35°C – 37°C en condiciones aeróbicas por 24 horas.

Lectura:

- a) Evaluar a las 24 horas; si no hay crecimiento dejar 48 horas más.
- b) La evaluación consiste en el recuento de colonias y se multiplica por factor de dilución para obtener UFC/ml.

Interpretación:

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

Nota: Siempre se usará asa calibrada de siembra: 0.001 ml para todas las muestras.

Si las muestras son de infantes, punción suprapúbica se usará asa de siembra: 0.01 ml pro estar asociado a infección con recuento a  $< 10^5$  UFC/mL.

Si no tiene asa calibrada de 0.01 usar la pipeta de 10 microlitos.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

6.5.2. SIEMBRA DE MUESTRA DE SANGRE: HEMOCULTIVO

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 025**

Sección Microbiología

Definición:

Es el procedimiento que se aplica para el aislamiento bacteriano a partir de Hemocultivos en el diagnóstico de infecciones del torrente sanguíneo.

Objetivo:

Describir la técnica de siembra primaria de hemocultivo para aislamiento de bacterias causante de infecciones.

Materiales y Equipos:

- Estufa de 35°C – 37°C
- Mechero Bunsen o cabina de flujo laminar
- Jeringa estéril
- Guantes de látex
- Alcohol al 70%
- Contenedor de material contaminado
- Medios de cultivo:
  - Medio bifásico Ruiz Castañeda o Monofásico
  - Medio monofásico (caldo TSA + anticoagulante: PBS)
  - Agar sangre de carnero (AS)
  - Agar Mc Conkey (McC)
  - Se puede incluir otros medios (Ejm.: Manitol salado)

Procedimiento:

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



Subcultivo:

- Se deberán realizar cerca del mechero Bunsen o cabina.
- Realizar subcultivos ciegos dentro de las 12 y 24 horas de inoculación.
- Para realizar los subcultivos, desinfectar la superficie de la tapa del frasco con alcohol 70%.
- Con una jeringa estéril, extraer a través del tapón de jebe la muestra de sangre.
- Inocular una gota de la muestra del hemocultivo en un extremo de la superficie de las placas de agar sangre, agar Mc Conkey y colocar cuidadosamente una gota sobre una lámina portaobjeto para hacer un frotis y coloración gram.
- Usando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión en los cuatro cuadrantes de la placa con el propósito de obtener colonias aisladas (Ver Anexo N° ).

Lectura de Subcultivos:

- A las 24 horas observar el crecimiento de colonias. Si no se observa desarrollo, incubar 24 horas más.
- Cuando se ha confirmado crecimiento bacteriano por subcultivo, se puede cortar 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:** deben considerarse los datos clínicos individuales Staphylococcus coagulasa negativo, corinebacterias y especies de Bacillus son contaminantes frecuente y a menudo se aíslan 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 de drogas intravenosas se puede decir que la presencia de estos gérmenes se debe a contaminación se informará el resultado de cada frasco de hemocultivo individualmente.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

6.5.3. SIEMBRA DE MUESTRA DE HERIDA, HERIDA OPERATORIA, ÚLCERAS, ABSCESOS

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 026**

Sección Microbiología

Definición:

Es un procedimiento que se aplica para el cultivo de muestra de herida; herida operatoria; úlceras; abscesos para el diagnóstico bacteriológico en infecciones localizadas que causen bacteremia.

Objetivo:

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

Materiales y Equipos:

- Estufa de 35°C – 37°C
- Pipetas Pasteur esteriles
- Cabina o mechero Bunsen
- Guantes de látex
- Contenedor de material contaminado
- Medios de cultivo
  - Agar sangre de carnero
  - Agar Mc Conkey

\* Puede incluirse otros medios (Ejm.: manitol salado, agar Columbia CNA con 5% de sangre de carnero).

Procedimiento:

- Realizar los cultivos en una cabina o mechero Bunsen.
- Usar las placas cuando hayan alcanzado la temperatura del medio ambiente.
- Inoculación de la muestra:

- Muestra de aspirado purulento: con una gota de la muestra ayudo con pipeta Pasteur, inocular en un extremo de la superficie de la placa de agar sangre de carnero, agar Mc Conkey y/o otros medios.
- Hisopado de secreción: frotar rotando el hisopo sobre la superficie de los medios de cultivo tratando que toda su superficie haga contacto con el agar, empezando con el agar sangre, Mc Conkey y/o otros medios.
- Esterilizar el asa de siembra en el mechero Bunsen hasta que se ponga rojo vivo, dejar enfriar el asa.
- Usar el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa, el propósito es tener colonias aisladas.
- Incubar en AS a 35°C x 24 horas y en agar Mc Conkey en condiciones aerobicas y por 24 horas.
- Esterilizar el asa de siembra en el mechero.
- Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.

Lectura:

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

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

6.5.4. SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECIONES DE VÍAS RESPIRATORIA ALTA

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 027**

Sección Microbiología

Definición:

Se define como el procedimiento que se aplica para el cultivo de secreciones de vías respiratoria alta que pueden ser asiento de faringitis, nasofaringitis, otitis media, sinusitis, otitis; para el diagnóstico bacteriológico.

Objetivo:

Describir los procedimientos de siembra primaria para el diagnóstico de infecciones de una muestra de vías respiratoria alta.

Materiales y Equipos:

- Estufa 35°C – 37°C
- Mechero Bunsen o cabina
- Asa de siembra estéril
- Guantes de látex
- Agar sangre de carnero (AS)
- Agar Mc Conkey (McC)

Procedimiento:

- Encender el mechero Bunsen o cabina.
- Tomar el hisopo y se frota sobre un cuadrante de la placa de agar AS y se estriará el resto de superficie con el asa de siembra estéril.
- Repetir lo mismo en los demás medios de cultivo.
- Colocar luego el hisopo que se encuentra dentro del caldo TSA en incubación a 35°C – 37°C x 24 horas, lo mismo hacer con las placas inoculadas.
- Concluida la siembra colocar en estufa las placas con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.

- Si no hay crecimiento en 24 horas seguir incubando hasta 48 horas.

Otros autores, en sus estudios dicen que la mejor incubación es la anaeróbica para hallar Streptococo y el uso de cotrimoxazol (disco usado en ATB) para acelerar la identificación presuntiva de colonias  $\beta$  hemolíticas y bacitracina para diferenciar la familia estreptocócica; otro método para aumentar hemólisis es colocar el asa de siembra en forma perpendicular (con la muestra) y atravesar sobre el agar sangre.

**Frotis**

Seleccionar la porcion mas representativa de la muestra  
Suavemente extender sobre la lamina porta objeto  
Dejar secar en el aire de preferencia en la cabina  
Fijar con metanol y colorear por Gram  
Realizar la lectura

**Lectura:** a las 24 hrs.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

6.5.5. SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECIÓN DE VÍA RESPIRATORIA BAJA

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 028**

Sección Microbiología

Definición:

Se define como el procedimiento que se aplica para el cultivo de diagnóstico de infecciones de vías respiratoria Baja.

Objetivo:

Describir paso a paso la siembra primaria para el estudio bacteriológico de organismos relacionados con las infecciones de vías respiratoria Baja.

Materiales y Equipo:

- Mechero Bunsen o cabina
- Guantes estériles
- Asa de siembra
- Portaobjetos
- Medios de cultivo:
  - Agar Mc Conkey
  - Agar sangre de carnero
  - Se pueden usar otros (Saboraud, Cetrimide, Agar chocolate, EMB, agar sal 3%).
- Mascarilla

Procedimiento:

- Colocarse las barreras de seguridad
- Encender mechero Bunsen o cabina
- Flamear el asa de siembra, tomar la muestra (parte representativa).

- Inocular en Agar Sangre (AS) Agar Mc Conkey (AMcC), Agar chocolate.
- Incubar en Agar AS y ACH en CO<sub>2</sub> al 3 – 10% y los demás en aire a 35°C – 37°C
- Todas las placas incluyendo la jarra CO<sub>2</sub> llevar a 35°C. Incubar.
- Si se sospecha de hongos patógenos, sembrar en Saboraud agar además de AS.
- Si se sospecha de Yersinia pestis sembrar en Agar sal 3% además de AS.

Frotis:

- Seleccionar la porción más purulenta de la muestra que contenga sangre.
- Suavemente extender en lámina portaobjeto
- Dejar secar el frotis dentro de la cabina
- Fijar luego con metanol y colorear con gram
- Fijar luego con metanol y colorear con gram
- Usar bajo aumento (10X) para examinar el frotis y la determinación de PMN y células escamosas.

Lectura a las 24 horas:

- Si no hubiera crecimiento dejar hasta 48 horas.

Fecha:

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

6.5.6. SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DEL TRACTO GENITAL

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 029**

Sección Microbiología

Definición:

Este procedimiento se aplica en el cultivo de muestra para el diagnóstico de casos de infecciones del tracto genital debido a bacterias.

Objetivo:

Describir la técnica de siembra primaria de muestras de casos de infecciones del tracto genital por bacterias.

Material y Equipo:

- Estufa 35°C – 37°C
- Cabina o mechero Bunsen
- Guantes de látex
- Contenedor para material contaminado
- Medios de cultivo:
  - Agar sangre de carnero (AS)
  - Agar Mc Conkey (McC)
  - Otros medios como (Agar manitol salado, Thayer Martin, A. chocolate).

Procedimiento:

- Realizar los cultivos en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero Bunsen.
- Utilizar las placas en medios de cultivo que hayan alcanzado la temperatura ambiente.
- **Inoculación de la muestra:**



- Inocular una gota de la muestra (usando una pipeta Pasteur) en un extremo de la superficie de la placa de agar sangre de carnero, agar Mc Conkey y/u otros medios.
- **Hisopado de secreción:** frotar rotando el hisopo sobre la superficie de los medios de cultivo tratando que toda su superficie haga contacto con el agar empezando con el agar sangre de carnero, Mc Conkey y/o otros medios.
- Esterilizar el asa de siembra en el mechero de Bunsen hasta que se ponga rojo vivo, dejar enfriar el asa.
- Realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa, para obtener colonias aisladas (Ver Anexo N° ).
- Incubar las placas a 35°C – 37°C por 24 horas – 48 horas en condiciones aeróbicas.
- Esterilizar el asa de siembra en el mechero.
- Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- En el caso que estemos buscando *Neisseria gonorrhoeae* incubar a 37°C por 18 – 72 horas a condiciones anaeróbicas: 5–10% CO<sub>2</sub> con 70 a 80% humedad; colocarlo en una jarra gas pack y llevar a la incubadora.

Lectura:

- A las 24 horas observar el crecimiento de colonias. Si no se observa crecimiento dejar incubando hasta 48 horas.
- Si se ha seguido correctamente los procedimientos de una buena obtención y conservación de la muestra, el aislamiento de una colonia es significativ

Fecha:

--	--	--

Aprobación:

6.5.7. SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA: HECES – COPROCULTIVO

Unidad Orgánica: DSMC–SAD–SLC–HVLH

**Código N° 030**

Sección Microbiología

Definición:

Como el procedimiento que se aplica en el cultivo de muestra de heces para el diagnóstico bacteriológico.

Objetivo:

Describir las etapas de la siembra primaria de muestra de heces.

Materiales y Equipo:

- Guantes estériles y mascarillas
- Mechero Bunsen y/o cabina biológica
- Contenedor de material contaminado
- Estufa de 35° - 37°C
- Medio de transporte: Cory Blair
- Medio de cultivo:
  - Caldo SS, caldo tetrionato, Agar SS, Agar Mc Conkey, Agar TCBS, y otros como Agar Campilobacter, Agar sangre, ampicilina, Agar XLD, agua peptonada.
- Asa de siembra

Procedimiento:

- Las muestras y el medio de cultivo deben estar dentro de la cabina de seguridad.
- Las placas con los medios elegidos deben estar a temperatura ambiente.
- El asa de siembra debe flamearse en el mechero Bunsen.
- **Inoculación de la muestra:**
  - a) Muestra recolectado en frasco de boca ancha: con el asa de siembra tomar una gota de la muestra en un extremo de la

- superficie de la placa del agar Mc Conkey, SS e inocular sobre ella, flamear el asa de siembra.
- b) Para otros microorganismos; tomar con el asa de siembra e inocular los caldos: SS; agua peptonada. Incubar a 35°C – 37°C por 18 al caldo SS y al agua peptonada 6 – 8 horas.
  - c) Hisopado rectal: frotar rotando el hisopo sobre la superficie de los medios de cultivo tratando que toda superficie haga contacto con el agar y/o caldo de cultivo.
- o Esterilizar el asa de siembra en el mechero Bunsen hasta que se ponga al rojo vivo, dejar enfriar el asa.
  - o Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central del inóculo realizar la siembra por agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa, con el propósito de obtener colonias aisladas.
  - o Incubar a 35°C – 37°C por 18 horas a lo referente al caldo SS y al agua peptonada 6 – 8 horas; a la misma temperatura.
  - o En cuanto a las placas: concluida la siembra, cerrar la placa y colocarlo en la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
  - o Luego de las horas cumplidas, tomar de los caldos: SS: una asada con el asa de siembra e inocular a la placa de agar SS y realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa. AP: Tomar una gota con el asa de siembra e inocular a la placa de agar TCBS y realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa. Incubar a 35°C – 37°C por 24 horas; en condiciones aeróbicas.

Lectura:

- o A las 24 horas observar el crecimiento de colonias.

Fecha:

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_



## 6.6. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 031**

Sección Microbiología

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

Se debe mantener las medidas de Bioseguridad en el manejo de reactivos y cultivos.

### • COCOS GRAM POSITIVOS

#### 6.6.1. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA DE COCOS GRAM POSITIVOS:

Definición: Es el proceso por el cual se identifica a los cocos gram positivos: staphylococcus, streptococcus, enterococcus a partir de muestras clínicas.

Objetivo: Determinar el microorganismo causante de una infección, y/o agentes responsable de infecciones intrahospitalarias.

#### 6.6.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

- a) Tomar en cuenta al determinar si un aislamiento es estafilococo estreptococo o enterococo. Esta diferenciación se realiza en base a la morfología de la colonia, hemólisis, forma de las bacterias por coloración gram a partir de un cultivo y la aplicación de la prueba de catalasa.
- b) Las colonias de estafilococo son de 2 m.m. – 3 mm. a las 24 hrs. Convexas, lisas, entera, opacas y con frecuencia pigmentada, las colonias de estreptococo y enterococo son más pequeñas < 2 mm. de diámetro puntiforme, con aspecto translúcido a semiopaco.
- c) Los estafilococos pueden ser fuertemente  $\beta$  hemolítico en agar sangre de carnero, pero las zonas de hemólisis son menores en relación al tamaño de las colonias que las generadas por los enterococos y estreptococos hemolíticos.
- d) Los estafilococos se agrupan generalmente en racimos, a diferencia de los estreptococos y enterococos que se reúnen en pares o cadenas.

6.6.1.2. LECTURA DE CULTIVOS EN AGAR SANGRE DE CARNERO Y AGAR COLUMBIA  
CNA-SANGRE: *Staphylococcus*

a) Morfología de las colonias

Las colonias de la mayoría de *Staphylococcus* son lisas, enteras, algo elevadas. Miden de 1-3 mm. de diámetro a las 24 hrs. Si las placas se siguen incubando tres días a 35° - 37°C las colonias pueden medir de 3-8 mm. dependiendo de las especies.

Las colonias de *Staphylococcus epidermidis* son algo más pequeños dependiendo de las cepas; usualmente no se detecta pigmentos.

Las colonias de *Staphylococcus saprophyticus* son más grande que *S. epidermidis*, son lustrosas y convexas, un 50% de las cepas son pigmentadas.

b) Coloración gram

Hacer una coloración gram de las colonias sospechosas y observar al microscopio.

Si se observan cocos gram positivos en racimos realizar la prueba de la catalasa.

c) Prueba de la catalasa

Determina la presencia de enzima catalasa, esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

Procedimiento:

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18 -24 hrs. y colocar sobre un portaobjeto limpio.
- Agregar una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de oxígeno) al 3% usando un gotero o pipeta Pasteur.
- No es necesario mezclar el cultivo con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Observar de inmediato la efervescencia (formación de burbujas) lo que indica una prueba positiva, de lo contrario es negativo.
- Desechar la lámina con un desinfectante.
- Realizar los controles respectivos

Control Positivo : *S. aureus*

Control Negativo: *Streptococcus spp*

**Nota:** Al coger una cepa o colonia con el asa de siembra tener cuidado de no llevar restos de A. sangre porque los eritrocitos contienen catalasa y pueden dar falso positivo.

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 un coágulo de fibrina.

- Prueba en lámina (detecta factor de aglutinación)
- Prueba en tubo (detecta coagulasa libre y ligada)

- La prueba en tubo es la definitiva, la prueba de coagulasa en lámina; es una prueba de tamizaje rápido, para la identificación de *S. aureus*.

Nota: Todas las pruebas negativo en lámina deben repetirse haciendo la prueba en tubo; (tiempo de la prueba 20 segundos en lámina).

- **Reactivo:** plasma de conejo deshidratado (reconstituir de acuerdo a la literatura del fabricante).

Nota: El plasma humano se usará siempre y cuando no contenga infección, inhibidores, capacidad de coagulación.

- **Controles:** Positivo : *S. aureus*  
Negativo : *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*

- Prueba en lámina: Método únicamente presuntivo

Procedimiento:

- Preparar una suspensión densa en solución fisiológica mezclando bien para homogenizar (solución fisiológica mezclando bien para homogenizar (solución fisiológica estéril al 0.85%).
- Si hubiera autoaglutinación no continuar y realizarlo en tubo.
- Agregar una gota de plasma y mezclar con movimiento circular.
- Observar la formación de aglutinación o precipitación dentro de 20 segundos.

**Prueba en tubo**

Procedimiento:

- Transferir una colonia aislada del agar de carnero al 0.5 mL de plasma reconstituido (en un tubo de vidrio estéril de 13 x 100).
- Girar el tubo suavemente para lograr la suspensión del organismo
- No agitar

- Incubar a 35° - 37°C (en baño María) por 4 horas; observar si hay formación de coágulo inclinando lentamente el tubo.
  - Observar cuidadosamente si hay formación de coágulo inclinando lentamente el tubo en intervalos hasta las 4 horas.
  - La mayoría de los *S. aureus* forman coágulo dentro de una (1) hora.
  - Si es negativo a las 4 horas seguir incubando hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Esto es recomendado porque hay un número pequeño de *S. aureus* que necesitan más de 4 horas; considerar que los *S. aureus* producen fibrinolisis y pueden lisar el coágulo.
  - Si es positivo se identifica como *Staphylococcus aureus*.
  - Si son negativo realizar la prueba de resistencia a la polimixina B y Novobiocina (5 ug), para tener una identificación presuntiva:  
*S. saprophyticus* es resistente a la novobiocina  
*S. epidermidis* es resistente a la polimixina B.
- e) Resistencia a la Novobiocina  
Esta prueba se realiza principalmente para distinguir *S. saprophyticus* de otras especies de importancia clínica.

Medios y Reactivos

- Agar TSA con sangre de carnero o Agar Mueller Hinton
- Suero fisiológico o caldo TSA
- Discos de Novobiocina (5 ug por disco)
- Escala 0.5 de Mc Farland
- Incubadora 35°C – 37°C
- Regla, hisopos estéril

Procedimiento:

- A partir de colonias aisladas y cultivadas por 24 horas hacer una suspensión equivalente a la escala 0.5 de Mac Farla.
- 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.
- Inocular sobre la superficie seca de una placa con agar sangre de carnero estriando homogéneamente con el hisopo sobre la superficie del agar. Repetir el proceso 2 veces, rotando la placa 90°.

- Dejar de 3 – 5 minutos a temperatura ambiente.
- Colocar el disco de novobiocina y presionar suavemente.
- Incubar 35° - 37° C por 24 horas.

Lectura:

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

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

f) Resistencia a la polimixina B

Medios y Reactivos

A. TSA con sangre de  
Suero fisiológico o caldo TSA  
Discos de polimixina  $\beta$  (300 U por disco)  
Escala 0.5 Mac Farland  
Regla, hisopo estéril

Procedimiento:

Realizar el mismo procedimiento descrito anteriormente para detectar resistencia a la novobiocina.

Lectura:

Observar la inhibición < de 10 mm.

*S. aureus* y *S. epidermidis* son usualmente resistente.

g) Otras pruebas: Agar manitol salado: *S. aureus* (fermenta el manitol).

6.6.1.3. LECTURA DE CULTIVOS EN AGAR SANGRE DE CARNERO Y AGAR COLUMBIA  
CNA – SANGRE: *Streptococcus*

a) Morfología de las colonias

Las células son esféricas u ovoides, son pequeñas grises delicadas opalescentes colonias; son visible en agar sangre generalmente de 18 -24 horas. Algunas son redondas de bordes lisos o ligeramente arrugados.

Los *Streptococos* del grupo F y G forman colonias (diminutas *estreptococo*) muy pequeñas. Los ***Streptococo* grupo A**; las colonias son



mate, brillante y mucoso producen beta – hemólisis y la estreptolisina S es la responsable de la hemólisis.

**Los estreptococo grupo B** colonias mucho más grande cuando se encuentra enclavada en el agar sangre y son beta-hemólisis de doble zona.

**Los estreptococo grupo C:** Son las colonias > 0.5 mm; algunas son de color miel y consistencia viscosa; también produce Beta-hemólisis.

**Los estreptococo grupo F:** Son colonias muy diminutas, transparente, como la cabeza de alfiler, beta hemólisis muy escasa.

**Los estreptococo grupo G:** Algunos son grandes y otras medianas mate, forman una zona ancha de beta hemólisis.

**Otros estreptococos no clasificados:** no presentan hemólisis en Agar sangre; son colonias pequeñas, redondas, etc.

b) Coloración Gram:

Son Gram positivas y algunas especies se decoloran. Se presentan en cadenas cortas o largas o en pares pero nunca en paquetes. Son esféricos, algunos presentan un aspecto de diplocócico y en ocasiones se ven formas parecidas a bacilos; muy escasa presentación.

c) Identificación presuntiva de estreptococo basada en hallazgos fisiológicos:

Hemólisis	Beta	Beta	Beta	Alfa, Beta ninguna	Alfa Ninguna	Alfa Ninguna	Alfa
Susceptible a la Bacitracina	+	- +	- +	-	-	- +	
Hidrólisis de hipurato o reacción comp.	-	+	-	-	-	+	-
Hidrólisis bilis esculina	-	-	-	+	-	-	-
Tolerancia a la sal CINA 6.5%	-		-	+	-	-	-
Susceptibilidad optoquina	-	-	-	-	-	+	
Identificación presuntiva	Grupo A (Pyogenes)	Grupo B	Beta hemolítico No grupo A, B, D	Enterococo Grupo A	Grupo D No enterococo	Viridians	Neumococo

d) Susceptibilidad a la Bacitracina

Esta prueba se usa para la diferenciación presuntiva de estreptococos A.

Medios y Reactivos

- TSA con sangre de carnero o Agar Mueller Hynton
- SF o caldo TSA, hisopos estériles, pinza estéril
- Disco de Bacitracina (0.04 U) → disco diferencial
- Incubadora a 35° - 37°C, escala 1.5 de Mc Farland

Procedimiento:

- A partir de colonias aisladas y cultivadas por 24 horas hacer una suspensión equivalente a la escala 1.5 Mc Farland (15 cepas + 2 ml de caldo).
- Sumergir un hisopo estéril dentro de la suspensión, 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 con sangre de carnero estriando homogéneamente con el hisopo sobre la superficie del agar. Repetir este procedimiento dos veces, rotando la placa 90°.
- Dejar de 3 – 5 minutos a temperatura ambiente para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.
- Colocar el disco de Bacitracina presionar con una pinza estéril.
- Incubar 35° - 37°C por 24 horas.

Lectura:

- Cualquier zona de inhibición, cualquiera sea su diámetro, significa que el cultivo es positivo.
- La ausencia de zona de inhibición, con crecimiento hasta el mismo borde del disco, significa que el cultivo es resistente.

Susceptibilidad a la Bacitracina

Esta prueba se usa para la diferenciación presuntiva de *Streptococcus pneumoniae* – neumococo.

Medios y Reactivos

- TSA con sangre de carnero.
- SF o caldo TSA; hisopos estériles, pinza estéril.
- Disco de optoquina de 6 mm, 10 mm.
- Incubadora 37°C
- Jarra + vela
- Regla

Procedimiento

- Sembrar la superficie de la mitad de la placa de agar sangre con 1 a 3 colonias sospechosas.
- Con pinza flameada colocar el disco de optoquina en el centro del área inoculada.
- Incubar a 37°C en una jarra + vela (en condiciones CO<sub>2</sub>).
- Medir zona de inhibición en mm, incluyendo el diámetro del disco.

Lectura

Si se usa disco de 6mm: positivo ⇒ zona de inhibición de 14 mm o más  
negativo⇒ no hay zona de inhibición  
dudoso ⇒ cualquier zona de inhibición menor de 14 mm; probar con solubilidad con bilis.

Si se usa disco de 10 mm: positivo ⇒ zona de inhibición de 16 mm o más  
negativo⇒ sin zona de inhibición  
dudoso ⇒ cualquier zona de inhibición menor de 16 mm.

- Los estreptococos típicos y la prueba positiva de optoquina, indican *S. pneumoniae*. Los cultivos que dan prueba de optoquina dudosa pueden ser estreptococo α hemolítico o *S. pneumoniae*. Estos cultivos deben probarse para solubilidad de bilis, prueba de Quellung o pruebas de aglutinación.
- Si son solubles en bilis pero dan pequeñas zonas de sensibilidad a la optoquina, identificar como neumococos.

e) Solubilidad en bilis

Es una prueba rápida para la identificación de neumococo.

Medios y Reactivos

- Agar sangre con cultivo
- Desoxicolato acuoso 10% estéril
- Pipeta Pasteur estéril + goma o capuchón

Procedimiento

- Agregar una gota del reactivo desoxicolato acuoso al 10% sobre las colonias sospechosas en agar sangre.

- Dejar absorber el reactivo sobre el agar por 20 minutos.
- No hacer flotar la colonia agregándole el reactivo forzosamente.

Lectura

- Las colonias de estreptococo producen color verde y no se lisan.
- Las colonias de neumococo producen verde y se lisan en 5 minutos.

6.6.1.4. LECTURA DE CULTIVO EN AGAR SANGRE DE CARNERO Y AGAR COLUMBIA  
 CNA SANGRE: ENTEROCOCOS

- a) Morfología de las colonias  
 Son redondas, son alfa hemolítica o no hemolíticas; y algunas como *E. durans* son beta hemolítica; se observan separadas.
- b) Coloración Gram
- El Gram realizado de la placa de agar sangre se ven de forma cocobacilar, en pares y cuando se toman del caldo thioglicolato se ven en forma de cadenas cortas; gram positivos.
  - Al observar estas presentaciones realizar la prueba de optoquina.

**Principales características fenotípicas de Enterococos: Gram positivos en cadena, catalasa negativo**

Especie	Bilis esculina	CINa 6.5%	Crecimiento		Hemólisis
			10°C	45°C	
Enterococcus	+	+	+	+	$\alpha, \beta, \eta$

- c) Prueba de la catalasa  
 Realizar como el procedimiento: 6.6.3.
- d) Prueba de la esculina en medio con bilis  
 Este procedimiento es para determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculatina y glucosa, en presencia de bilis.

Procedimiento

Inocular el cultivo en estudio haciendo estrías sobre el pico de planta; o de la placa de agar bilis esculina.



Incubar a 35° - 37° a por 72 horas.

Se puede controlar hasta 72 horas antes de informar como negativo.

Lectura

Positivo: En tubo : ennegrecimiento difuso en plano inclinado.

En placa: se observa un halo de color negro alrededor de la colonia.

Negativo: No produce color de menos de la mitad del tubo o en la placa; después de 72 horas de incubación.

e) Tolerancia al cloruro de sodio CINA

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

Materiales y Reactivos

Caldo TSA 25 grs.

CINa 60 grs.

Dextrosa 1 gr.

Agua destilada 1000 ml.

Preparar el caldo y esterilizar por autoclave.

Procedimiento

Inocular en el caldo TSA con cloruro de sodio un cultivo de 18 – 24 horas de incubación. Incubar a 35° - 37°C por 24 horas.

Se puede controlar periódicamente y esperar hasta las 72 horas antes de informar negativo.

Lectura

Positivo : Hay desarrollo bacteriano

Negativo : No se observa crecimiento en el caldo

f) Crecimiento en telurito de potasio

Es útil para la identificación de *E. faecalis*

6.6.2.1. Lectura de Cultivos en Agar Mac Conkey

- a) *Escherichia coli*: lactosa + colonias de borde entero de color fucsia, opaca de 2 mm – 3 mm de diámetro, usualmente rodeados de una zona opaca alrededor de la colonia (bilis precipitada); las cepas de *Escherichia coli*: lactosa – dan colonias incoloras de 3 a 4 mm.
- b) *Klebsiella pneumoniae*: lactosa +, crecimiento mucoso; colonias de borde entero, de color rosado a rosado oscuro, de 3 a 4 mm. de diámetro.
- c) *Enterobacter spp*: lactosa + son colonias de borde entero, color rosado 2 a 4 mm de diámetro, no muy mucoso.
- d) *Edwardsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Arizona*, *Ervinia* son bacterias que fermentan la lactosa muy lentamente.
- e) *Shigella*: lactosa -, colonias convexas, circulares transparentes de 2 mm de diámetro, también crece en Agar SS, Agar XLD.
- f) *Salmonella*: lactosa -, colonias puntiforme, translúcidos con presencia de H<sub>2</sub>S; de 1 a 2 mm de diámetro, también en Agar SS, agar XLD.
- g) *Proteus*: son lactosa-, colonias, en ondas de crecimiento, y en cantidad > en medio sólido; (diseminación).
- h) *Pseudomonas*: son lactosa -, colonias mucosas, ondeante, muy translúcidos; con bordes marrones, en algunos casos crece en Agar SS y caldo SS; con pigmentación amarillo verdoso, verde azulado, olor dulzón a frutas, también crece en Agar cetrimide.
- i) *Yersinia*: lactosa – colonias translucidas como la *E. coli* (lactosa negativa).

6.6.2.2. Lectura de Cultivos en Agar TCBS

- a) *Vibrio cholerae* -, Produce colonias amarillas, convexas lisas redondas opacas, 0.5 – 1 mm de diámetro; se parecen a la yema de huevo. También crece en agar SS y Agar Mac Conkey.
- b) *Vibrio parahaemolyticus*. Produce colonias verdes, puntiformes también crece en Agar sal manitol, AMcC, XLD.
- c) *Vibrio vulnificus*. Produce colonias azul verdosas.

6.6.2.3. Lectura de Cultivos en Agar Mac Conkey: Bacterias especiales

- Aeromonas: Lactosa – colonias pequeñas; también crece en agar sangre ampicilina; (hemolisina beta), DNASA.

6.6.2.4. Lectura de cultivos en Agar Sangre: Otras Bacterias

- Plesiomonas: lactosa – colonias pequeñas  
También crece en Agar Hektoen, Agar sangre  
Agar Inositol (verde brillante, diseminada bordes marrones.)

6.6.2.5. Bacterias que necesitan nutrientes adecuados y suplementos que inhiben a otros gérmenes

- a) Caldo SS: Inocular e incubar 35° - 37°C x 18 – 14 horas.  
Salmonella, Shiguella, Pseudomonas
  - b) Caldo tetrionato sin yodo: Inocular e incubar a 40°C. Plesiomonas
  - c) Caldo peptonado (agua peptonado)
- Inocular e incubar 35° - 37°C x 6 – 8 horas
    - Vibrión cholerae
    - Vibrión parahemolítico
    - Campilobacter
  - Inocular e incubar a 28°C x 18 – 24 horas Aeromonas.
- d) Caldo TSA: inocular e incubar 35° - 37°C x 18 – 24 horas todas las enterobacterias ATCC para estudio; toda muestra que incluye investigar gram (-).
  - e) Caldo TSA + ampicilina: incubar e inocular a 28°C x 18 – 24 horas (aeromonas).
  - f) Caldo Muller Hynton: Inocular a partir del TSI subcultivo de colonia a investigar incubar a 35° - 37°C x 2 – 3 horas para pruebas de sensibilidad.

6.6.2.6. Pruebas Bioquímicas

- a) Utilización de lactosa.
- b) Utilización de glucosa
- c) Producción de gas de glucosa
- d) Descarboxilación de lisina
- e) Producción de H<sub>2</sub>S (SIM)
- f) Utilización del citrato
- g) Producción de ureasa
- h) Prueba MR (rojo de metilo)
- i) Prueba VP (Voges Proskaver)
- j) Motilidad (SIM)
- k) Producción de Indol (SIM)
- l) Prueba de catalasa
- m) Prueba de oxidasa
- n) Prueba de gelatinasa (Hidrólisis)

6.6.2.7. Procedimiento

- Identificar la colonia sospechosa que se encuentra en la placa de agar Mc Conkey, TCBS, Agar SS, y otros.
- Esterilizar al rojo vivo el asa de siembra recta en un mechero de Bunsen.
- Enfriar el asa.
- 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, agar urea (en la superficie) TSI, LIA (introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, retirar por el mismo trazo y sembrar en estría la parte inclinada) caldo para la prueba de MR, VP.
- Sembrar por puntura en el centro agar SIM, gelatina; hasta una profundidad aproximada de 1 – 5 cm.
- Incubar a 35° - 37°C de 18 – 24 horas.





6.6.2.8. Lecturas

a) TSI Agar

Aquí se determina la capacidad de la bacteria de utilizar la lactosa, glucosa y sacarosa, con producción o no de gas y la producción de H<sub>2</sub>S (ácido sulfhídrico).

Lectura

- Importante hacer la lectura entre las 18 – 24 horas para no obtener resultados erróneos.
- La lectura se hace sobre la base de 3 características.
  - a) Utilización de hidratos de carbono
  - b) Producción de gas
  - c) Producción de H<sub>2</sub>S

a) Utilización de hidratos de carbono

- Utilización de lactosa: Reacc. ácido en el pico de flauta (color amarillo) abreviatura (A).
- No hay utilización del carbohidrato: se puede observar una reacción alcalina (color rojo) o que no hay cambio de color (permanece del mismo color que el medio no inoculado). Abreviaturas: (K) o (N) respectivamente.

Ojo: Cuando el microorganismo también produce H<sub>2</sub>S el precipitado negro puede ocultar la acidez.

b) Producción de gas de glucosa

- Se considera positivo: Presencia de una sola burbuja de gas, burbujas en el medio, división del medio, desplazamiento completo del medio del fondo del tubo dejando un área clara o una ligera muesca del medio en el costado del tubo.
- Se registra la lectura por cruces (+)

- c) Producción de ácido sulfhídrico
  - Se manifiesta por un color negro distribuido por toda la columna del medio de cultivo o sólo en la parte superior.
  - Se registra la lectura por medio de cruces (+).

- Resultados

Ejemplo de simbolización e interpretación:

K/A - + : significa alcalinidad en la inclinación y acidez en el fondo (fermentación de glucosa) gas negativo y H<sub>2</sub>S positivo.

N/N - - : significa no hay utilización de la lactosa y glucosa ni producción de gas y H<sub>2</sub>S.

- Recomendaciones

Si se observa que no hay cambio de color en el tubo hasta las 24 horas según incubando hasta las 48 horas.

Si no hay viraje de color y hay desarrollo, se trata de una bacteria no fermentadora (Ej., Fm. Pseudomonas).

**b) LIA agar**

En este medio se determina simultáneamente la producción de lisina descarboxilasa y producción de H<sub>2</sub>S.

Lectura:

Es importante hacer la lectura 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.

OJO: Generalmente las cepas del grupo Proteus y Providencia, desaminan la lisina a ácido  $\alpha$  cetocarbónico. Este último forma compuesto pardo rojizo

en la región superficial del medio con sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno.

**c) Utilización de citrato**

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

Procedimiento

- Incubar a 35° - 37° C, 24 – 48 horas  
En algunos casos es necesaria 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).

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

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

Procedimiento

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

Resultados

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

**e) Rojo de metilo**

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

Procedimiento

El caldo debe ser incubado a 35° - 37° C durante 48 - 72 horas. Asépticamente retirar 2.5 ml. de caldo a un tubo estéril. Añadir directamente al caldo 5 gotas del reactivo rojo de metilo (indicador de pH). Interpretar rápidamente el resultado.

**Nota:** No debe hacerse la lectura antes de las 48 horas para evitar resultados erróneos.

Resultados

El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica que la producción de ácido es suficiente como para bajar el pH a 4.4 y es una prueba positiva.

Un color naranja (pH 5.0 - 5.8) indica prueba negativa.

**f) Voges Proskauer**

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

- Medios y reactivos
  - Medio MR VP
  - $\alpha$  naftol al 5%
  - KOH al 40%

Procedimientos

Incubar por 24 - 48 horas a 35° - 37° C

Transferir 1 ml. de caldo a un tubo de ensayo limpio. Añadir con una pipeta

Pasteur 0.6 ml. de  $\alpha$  naftol al 5% y 0.2 ml. de KOH al 40%.

Agitar el tubo cuidadosamente (para exponerlo al oxígeno atmosférico) dejar reposar durante 10 a 15 minutos.

Resultado

Prueba positiva: Desarrollo de un color rojo rosado en la superficie del medio.

Prueba negativo: mantiene su color

**g) Motilidad** (Medido SIM o MIO o agar movilidad)

Para determinar si un organismo es móvil o inmóvil

Procedimiento

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

Resultados

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

También puede manifestarse semejjando “vellosidades a lo largo del trozo de siembra”.

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

**h) Prueba de Indol**

Es útil para determinar la capacidad de un microorganismo de producir indol a partir del aminoácido triptófano.

Medios y Reactivos

Caldo de triptófano o de peptona o caldo de tristona

Reactivo de indol de Kovacs

Procedimiento

Retirar asépticamente 2 ml. de caldo de cultivo con 24 horas de incubación.

Agregar 5 gotas de reactivo de kovacs.

Mover suavemente el tubo y realizar la lectura.

Evaluar el cultivo a las 24 horas; si la lectura es negativa, deberá incubarse otras 24 horas, el cultivo restante y repetir la prueba.

#### Resultados

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

Prueba negativa: toma el color del reactivo empleado.

#### **i) 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 3%.

#### Procedimiento

Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18 – 24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio.

Agregar una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% usando un gotero o una pipeta Pasteur.

No es necesario mezclar el cultivo con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Observar una inmediata efervescencia; lo que indica una prueba positiva, de lo contrario se considera la prueba negativa.

Desechar el portaobjeto colocándolo en un desinfectante.

**Nota:** Al coger la colonia con el asa de siembra tener cuidado de no llevar algo del medio del agar sangre; debido que la catalasa está presente en los glóbulos rojos, puede dar falso positivo.

No invertir los procedimientos pueden dar falso positivo.

Para enterobacterias; tomar la cepa del agar TSA en plano inclinado como si fuera diferencial; realizar los procedimientos.

#### **j) Prueba de la Gelatina**

(Hidrólisis de la gelatina)



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

Medio:

Gelatina nutritiva pH 6.8

Procedimiento

Utilizando una asa de siembra en punta y a partir de un cultivo puro de 18 – 24 horas coger un inóculo abundante y hacer una punción en el centro y en forma vertical en el medio de la gelatina hasta la profundidad de 1.5 a 2.5 cm.

Utilizar un tubo con medio de gelatina sin incubar como control de la prueba.

Incubar los cultivos en estudio y de control a 22° - 25° C por 24 – 48 horas.

Hacer la lectura.

Evaluar diariamente el cultivo durante 14 días.

Al término de cada período de 24 horas colocar el control (tubo) y el de estudio en el refrigerador o en un recipiente con hielo durante 2 horas para determinar si se ha producido o no la digestión de la gelatina (licuefacción).

Realizar las lecturas observando si hay crecimiento (turbidez) y licuefacción.

Resultados

Positivo : medio de cultivo semilíquido

Negativo : medio de cultivo sólido

**k) Prueba de Pigmentos**

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

Ejm.: Las Pseudomonas, Serratia.

Lectura

Si no se observara pigmento dejar la placa incubando a temperatura ambiente y realizar la lectura a las 48 horas.

**I) Prueba de Oxidasa**

Se trabaja a partir del crecimiento bacteriano en TSA o Mueller Hynton.  
Humedecer un trozo de papel con el reactivo dentro de una placa petri.  
Con ayuda de un mondadiente se coge la colonia y se extiende sobre el papel filtro.

Resultado

Positivo: viraje de color hacia el azul – violeta después de 10 – 15 segundos.

Negativo: no hay viraje de color

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_





## 7.0. PRUEBAS SEROLÓGICAS DE IDENTIFICACIÓN

Unidad Orgánica: DSMC–SAD–SLC–HVLH

**Código N°032**

Sección Microbiología

### Definición:

Como el procedimiento que se aplica en el laboratorio para conocer cuál es el serotipo, biotipo, subserotipo, etc. de los agentes infecciosos.

### Objetivo

Identificar serológicamente a las bacterias que causan cuadros infecciosos.

### 7.1. Condiciones Generales

- a) Que la prueba bioquímica sea compatible con el germen que se sospecha.
- b) Que sea cultivo puro +; no proceder a la serología si hay sospecha de mezclas bacterianas.
- c) La suspensión bacteriana debe ser homogénea no proseguir si hay autoaglutinación.
- d) Conocer los serogrupos o serotipos que cubre el suero inmune que se usa.

### Material

- Literines de vidrio 5 x 8 cm.
- Lápiz de cera
- Asa en aro
- Asa recta
- Solución salina formulada SSF
- Tubo de 10 x 75
- Sueros polivalente anti (bacterias como Salmonella A – B – C – D, *Escherichia coli*, *Shigella*, para determinar grupo *V. cholerae*, *aeromonas*, *plesiomonas*).

- Sueros para determinar serotipo específicos de las bacterias (*E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *V. cholerae*, *aeromonas*, *pleisiomonas*)
- Palillos de plástico (mondadientes).
- Bocal (con lejía al 3%)

Procedimiento

◦ **Preparación de la lámina**

Delinear los bordes de la lámina con el lápiz de cera.

Dividir el largo de la lámina con líneas paralelas cuya distancia entre ellas será de 1 cm.

Trazar una línea por el centro de la lámina, de tal forma que al cortar las paralelas anteriormente trazadas formen rectángulos iguales. Aproximadamente se obtendrán 14.

◦ **Preparación de la suspensión bacteriana**

En un tubo de 10 x 75 colocar 0.5 ml. de SSF (solución salina formolada) resuspender el crecimiento bacteriano recogido con el asa del TSI o LIA.

El anterior procedimiento se puede reemplazar, haciendo la suspensión bacteriana directamente en la lámina en una gotita de SSF, colocada con el asa en aro.

Otra alternativa es, haciendo, suspensión bacteriana directamente en la gotita del antisuero; este procedimiento se utilizará en casos de extrema urgencia, en cuyo caso, se deberá tener en cuenta que está trabajando con gérmenes vivos.

◦ **Reacción de aglutinación**

Procedimiento

Depositar con el asa en aro, una gota (0.02 ml) de suspensión bacteriana (antígeno) en un extremo del rectángulo. Quemar el asa.

Frente a la gota del antígeno colocar otra gota de igual volumen del suero inmune (anticuerpo). Secar el asa con un papel filtro. Mezclar con

el asa recta ambas gotas, e inmediatamente mover la lámina en vaivén por unas 15 veces para una mezcla óptima. Realizar la lectura e informar.

**7.2. Uso de los Sueros Inmunes**

Seguir el siguiente esquema:

a) *Escherichia coli*

	TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	LIA	Indol
1. Anaerogénicos	A/A ó K/A	-	-	K/K ó K/A	+
2. Aerogénicos	K/A ó A/A	++	-	K/A ó K/K	+

Suero (Anticuerpo) suspensión bacteriana (antígeno) Lectura	Poliv	Poliv	Poliv	
	A	B	C	
	•	•	•	
	+	-	-	EPEC grupo A
	-	+		EPEC grupo B
	-	-	+	EPEC grupo C

b) Serotipos de *Escherichia coli*


Repetir el procedimiento mencionado en Código N° y probar con los antígenos somáticos de cada grupo:

Polivalente A	Polivalente B	Polivalente C
026	086	018ac
055	0119	0114
0111	0125	0142
0128	0126	0158
	0127	

Seguir el siguiente esquema:

a) *Salmonella typhi*

TSI,	Gas,	H <sub>2</sub> S	LIA	Indol
K/A	-	+	K/K	-

	<b>Polivalente</b>	<b>D</b>	<b>Vi</b>	
<b>Suero</b>	○	○	○	
(Anticuerpo)	●	●	●	
suspensión bacteriana (antígeno)	+	+	+	Lectura

b) *Salmonella paratyphi A*

TSI,	Gas,	H <sub>2</sub> S	LIA	Indol
K/A	+	-	K/A	-

	<b>Polivalente</b>	<b>A</b>	
<b>Suero</b>	○	○	
(Anticuerpo)	●	●	
suspensión bacteriana (antígeno)	+	+	⇐ Lectura

c) Otras salmonellas

TSI,	Gas,	H <sub>2</sub> S	LIA	Indol
K/A	++	++++	K/K	-

<b>Suero</b>	<b>Polivalente</b>	<b>B</b>	<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>D</b>	<b>ε</b>	* Cualquier aglutinación en B, C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , D, ε y polivalente +
(Anticuerpo)	○	○	○	○	○	○	
Suspensión bacteriana (antígeno)	+	*	*	*	*	*	

Según el siguiente esquema:

Shiguella

Los cuatro grupos sexológicos:

Shiguelia dysenteriae, (A), Shiguelia flexneri, (V), Shiguelia boydii (C),  
Shiguelia sonnei (D).

Presentan la misma bioquímica:

TSI,	Gas,	H <sub>2</sub> S	LIA	Indol
K/A	-	-	K/A	+ ó -

Suero	Subgrupo				Subgrupo			Subgrupo		Subgrupo			
	B	B <sub>2α</sub>	B <sub>3α</sub>	B <sub>6α</sub>	A	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	C	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>
(Anticuerpo)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Suspensión bacteriana (antígeno)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

**Nota:** Lectura, los grupos son BACD se nombra primero el grupo más frecuente; luego el subgrupo de cada serotipo.

Seguir el siguiente esquema

*Vibrio cholerae*

TSI,	Gas,	H <sub>2</sub> S	LIA	Indol
K/A	-	-	K/K	+

Suero	Polivalente	Inaba	Ogawa	Hikojima	Serovar	
	(Anticuerpo)	○	○	○		
Suspensión bacteriana (antígeno)	●	●	●	●	Ogawa	Inaba - Ogawa +
					Hikojima	Inaba + Ogawa +

V. cholerae 01

Fecha:

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

### 8.0. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICO

Unidad Orgánica: DSMC-SAD-SLC-HVLH

**Código N° 033**

Sección Microbiología

Definición:

Es el procedimiento que se aplica en el laboratorio microbiológico, cuyo método a usar es el de susceptibilidad a antibióticos por medio de discos (Kirby – Bauer).

Objetivo:

Observar las zonas de inhibición que producen los antibióticos frente a la cepa en estudio.

Materiales y Reactivos

- Caldo TSA o CASO (repartir en tubos de 15 x 100 = 5 ml.)
- Agar Mueller Hinton o TSA o Caso (repartir en placas).
- Discos de sensibilidad
- Pinza estéril
- Asa de Kalle
- Mechero Bunsen, cabina de Bioseguridad
- St de Mac Farland 0.5 ( $10^8$  organismos/mL)
- Tabla de interpretación INS
- Pentagrama de comparación con escala Mac Farland.
- Preparación del Inóculo

Tomar con asa de Kalle platino, una porción de cultivo puro (TSI) y sembrar en el caldo Mueller Hinton.

Incubar la suspensión por un período de 2 – 3 horas, obtener una turbidez comparable al St de Mac Farland 0.5; incubar a 35°C si la suspensión está muy concentrada diluir con suero fisiológico.

**Nota:** Si no tuviera caldo TSA, caldo CASO, caldo Mueller Hinton usar solución salina al 0.85% y tomar 5 cepas puras y homogenizar usar el pentagrama para visualizar si hay turbidez comparativo con escala de

Mac Farland; el rayado del pentagrama no se ve e incubar 20 minutos x 35° C.

° Inoculación de las placas

1. Introducir un hisopo estéril en el caldo.
2. Elevar el hisopo sobre la superficie del caldo y rotar contra la pared del tubo para eliminar el exceso del inóculo.
3. Frotar la superficie del agar con el hisopo en 3 direcciones.
4. Dejar secar por 5 minutos con la placa cerrada.
5. Colocar los discos con pinza estéril. Los discos deben estar suficientemente separados para hacer la lectura.
6. Presionar suavemente los discos para asegurar su implantación en la superficie.
7. incubar a 35° C por 18 – 24 horas.

° Medición de halos

Las zonas de inhibición se miden sobre un fondo oscuro y por la parte posterior de la placa sin abrirla; en mm.

Después de la medida proceder a comparar con la tabla de interpretación del INS.

Fecha: 

--	--	--

Aprobación: \_\_\_\_\_

---

**BIBLIOGRAFIA**

1. Jack Bradshaw, Microbiología de Laboratorio  
Editorial El Manual Moderno, Mexico 1976
2. Crispín P. Víctor, Salcedo Coa Dario, Medio de Cultivo / Interpretación  
Bioquímica  
Editorial UNMS – Lima, 1977.
3. MINSA/Red Nacional de Laboratorios de Salud, Manual de Procedimientos  
técnicos para el Diagnóstico Serológico de Sífilis, Normas Técnicas nº 17  
Editorial: LANARE-Lima, 1997.
4. Grados B. Oscar, Guía para el Aislamiento y Vigilancia de Salmonella y  
Shigella , Lima, 1982.
5. Vandepitte J., Engback K., Piot P., Henck C.C, Métodos básicos en el  
Laboratorio de Microbiología, OMS-Ginebra, Suiza, 1993.
6. MINSA-Chile, Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico  
Editorial: INSP-Chile, 1998.
7. Jarett Leonard. Sonmenwirth Alex, Métodos y Diagnósticos del Laboratorio  
Clínico, Tomo II , Editorial: Panamericana, Buenos Aires-Argentina, 1983.
8. OGE-INS, Epidemiología de la Bartonelosis en el Perú-métodos técnico  
Editorial: MINSA, Lima, 2000.
9. Botero ,David, Restrepo, Marcos, Parasitosis Humanas  
Editorial : Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín-  
Colombia, 2001
10. Jawetz ,Melnick, Adelborg, Microbiología Médica  
Editorial: El Manual Moderno, 18 edición, Mexico, 2005.
11. Ventura Gladis, Padilla Carlos, Diagnóstico Bacteriológico de la  
Bartonelosis Humana o Enfermedad de Carrión,  
Editorial: CNSP-INS, Lima 2006.



# ANEXOS



ANEXO N° 1

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LIMPIEZA DE MATERIAL DE VIDRIO –  
PLÁSTICO

- Lejía o hipoclorito de sodio al 5%:  
5 ml de lejía  
95 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- Jabón líquido al 5%:  
5 ml de dextran o twin  
95 ml de agua caliente
- Ácido clorhídrico al 5%  
HNO<sub>3</sub> 20 ml QP  
Agua destilada 80 ml.
- Agua regia:  
HCl 1N 3 ml.
- HNO<sub>3</sub> 1N 1 ml.
- Solución alcohólica de NaOH o KOH:  
NaOH: 105 grs. o KOH: 120 grs.  
980 ml. etanol al 95%
- Sal de soda al 5%  
5 grs. de soda cáustica  
95 ml de agua corriente o hasta  
llegar a 100 mL.
- Solución ácido crómico:  
500 ml H<sub>2</sub>O destilada  
100 grs. dicromato de K  
250 ml. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
y completar hasta 1 lt. con agua  
destilada. (vidrio en general).
- Solución ácido crómico:  
5 grs. dicromato de K  
100 ml. agua destilada  
900 ml. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
(Plástico en general)
- Solución ácido Crómico:  
40 grs. dicromato de K  
100 ml. agua destilada  
900 ml. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
(para pipetas y tubos)



ANEXO N° 2

**MANEJO Y FUNCIONAMIENTO DE AUTOCLAVE  
(Esterilización por vapor a presión)**

1. Verter agua en cantidad suficiente en la olla primaria. La superficie del agua colocada en el fondo debe quedar por debajo del entrepaño inferior del soporte destinado a sostener los objetos a esterilizar (agua destilada).
2. Colocar en el interior de la olla secundaria los objetos a esterilizar (esta olla está sobre el soporte enrejado).
3. Cerrar o colocar la tapa introduciendo el apéndice dentro del canal de la olla secundaria y coincidiendo la flecha de la tapa sobre la marca exterior de la olla primaria.
4. Apretar los tornillos o clavos en cruz ajustando de a dos o pares hasta conseguir un ajuste parejo.
5. Levantar el botón de encendido y rodar el botón de temperatura por encima de LO hasta llegar a HI.
6. Verificar que la válvula de escape de vapor esté levantado.
7. Vigilar el escape del vapor por dicha válvula. En los primeros momentos saldrá discontinua y débil más tarde se hará continua y silvante, dura 20' (minutos).
8. Bajar la espita (válvula de escape de vapor).
9. Vigilar el termómetro y manómetro hasta alcanzar la temperatura y presión deseada (15 a 20 lbs.).
10. Mantener dicha temperatura por espacio de 15 minutos.
11. Luego apagar el aparato y (botón en HI) llevar el botón a LO.
12. Esperar 20 minutos, luego levantar la espita
13. Aflojar y quitar los tornillos o clavos y abrir el aparato.

### ANEXO N° 3

#### AGUA PARA LABORATORIO CLÍNICO

- El agua es el producto más usado en el laboratorio clínico. El agua al igual que otros productos químicos, se requiere en diversos grados de pureza; de acuerdo con el uso al cual se destine.

Los métodos de purificación son:

- **Destilación:** proceso que incluye color, vaporización y condensación, pero tiene limitaciones como su purificación implica solo eliminación de materias no volátiles. Las impurezas líquidos y componentes orgánicos con punto de ebullición 100°C se evaporan y se condensan junto con el agua destilada. El Na, K, Mg, CO, SO, se quedan en el destilador formando una capa en el destilador que causa corrosión.
- **Bidestilación:** se usa agua destilada + permanganato potásico (\*) en un equipo de cuarzo o estaño. El (\*) oxida las sustancias orgánicas.
- **Desionización:** El agua destilada se pasa a través de una columna portadora de lecho de resina intercambiadora de iones.
- **Ultrafiltración:** consiste en osmosis inversa, 1 U. de carbón vegetal, 2U. intercambio iónico, 1 U. filtración para eliminar partículas > de 0.22 um. Y una bomba de recirculación.

*Osmosis inversa:* el agua pasa a través de una membrana semipermeable que atrapa material orgánico e inorgánico, deja pasar 10% de impurezas.

#### GRADOS REACTIVOS DE AGUA

**Grado Tipo I:** de alta pureza; pasa por todos los métodos de purificación. Se usa para E. de abs. Atómica, fotometría, preparación de estándares, gases sanguíneos, solución amortiguadora, R. de liofilizados.

**Grado tipo II:** pasa por los métodos de purificación: destilación, bidestilación y desionización. Se usa en la mayoría de exámenes de química clínica (Bioquímica) hematología, serología, microbiología e inmunología.

**Grado tipo III:** pasa por destilación y se usa para procedimientos histológicos, análisis de orina y parasitología. La mayoría de procesos cualitativos y lavado de cristalería.



## ANEXO N° 4

CUADRO DE RIESGO DE INFECCIÓN DE DIVERSOS PROCEDIMIENTOS EM  
LA SECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA, REVELADOS POR TÉCNICAS DE  
MUESTREO DE AIRE

Riesgo de infección	N° promedio de microorganismos recuperados del aire 1 pie <sup>3</sup> /minuto
• Diseminación de placa de agar con inculo de colonia en agar.	0.1
• Agitación de asa de cultivo en tubo de ensayo	0.5
• Inserción de asa caliente en cultivo de caldo en tubo de ensayo frasco de 250 ml.	0.1
• Inserción de asa fría en cultivo de caldo en frasco de 250 ml.	8.7
• Pipeteo de 30 ml. de cultivo (1 x 10 <sup>9</sup> células /mL) en tubo de centrífuga de 50 ml.	0.8
• Gota de cultivo que cae 30 cm. sobre acero inoxidable	1.2
• Madera pintada	49.0
• Toalla de mano seca	43.0
• Toalla de mano humedecida con fenol 5%	28.0
• Cazuelita con fenol 5%	4.0
• Ruptura de tubo durante centrifugación agrietado pero sin salir de la cubeta (10 pies <sup>3</sup> muestra de aire)	0.1
• Deshecho con el cultivo derramado en la cámara de bioseguridad (10 pies <sup>3</sup> muestra de aire).	4.0
• Remoción de un tapón de algodón después de centrifugar (muestra de aire de 2 pies <sup>3</sup> )	183.0
• Remoción de 30 mL de sobrenadante decantar 1 tubo en frasco.	2.3
• Aspiración de 30 ml. de sobrenadante de c/u de 10 tubos	17.6
• Agregar 30 ml. de solución salina a 1 tubo de células empacadas centrifugadas y volver a suspender mezclando con aspiración y soplado alternado con pipeta.	3.0
• Estallido de película en asa de inoculación	4.5
• Colocar inculo para recuento de placa en cajita de petri con pipeta y soplar la última gota.	0.2
	3.8

\* Adaptado de Reitman y Philipos y Reitman y Wedum.

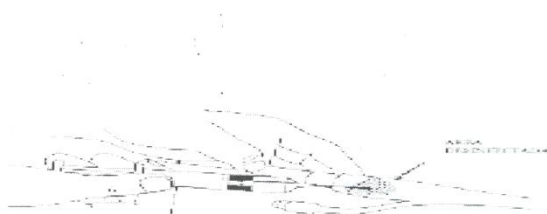


ANEXO N° 5

TOMA DE MUESTRAS



Método determinado para la toma de muestra de sangre venosa



Método para obtener : muestra de orina de catéter  
mediante punción.

ANEXO N° 6

MANEJO DE CABINA DE SEGURIDAD CLASE II

1. Primero limpieza del exterior de la cabina con gasa embebida de alcohol 70°G.
2. Levantar la pantalla y limpiar el interior (mesa) de trabajo.
3. Bajar la pantalla por completo verificar la mira digital dice FAN OFF
4. Levantar la pantalla hasta la marca de color negro (se observa en la parte frontal derecha del marco de pantalla) FAN UP (se enciende la luz de cabina)
5. Presionar el botón del lado izquierdo de la mira digital.
6. Inmediatamente se enciende el equipo y se apaga la luz interna, verificar mira digital (dice warming up), calentamiento de cabina, esperar 3 minutos.
7. Allí habrá una extracción de aire interno, se filtrará por medio de los filtros HEPA y terminado este evento la mira digital dirá SAFE AIR (aire estéril).
8. Verificar el aire estéril l: d: t:
9. Listo para comenzar a trabajar (queda encendido la luz interna de la cabina).
10. Luego de terminar los procedimientos repetir paso 1 y 2.
11. Bajar la pantalla y presionar la tecla UV durante 30' se esterilizará la mesa de trabajo.
12. Luego presionar la misma tecla (la mira digital dice PRESS ANY KEY)
13. Queda en UV MODE (mira digital).

ANEXO N° 7  
MANEJO DE BALANZA ANALÍTICA

1. Quitar el cobertor del equipo.
2. Verificar que el transformador esté conectado al punto de enchufe conexión).
3. Usar un punto múltiple redondo, luego enchufe
4. Encender el equipo apretando la tecla ON
5. Aparecerá en ventana o pantalla digital la palabra BOSCH y código de barras.
6. Luego el peso de 600 grs.
7. Luego el equipo se tarará solo y la pantalla mostrará 0,00.
8. Presionar la tecla TARE y saldrá 0,00
9. Luego presionar la tecla MODE y aparecerá la palabra CAL – CLARE y marcar CAL
10. Presionar la tecla YES, e inmediatamente hará un conteo (1, 2, 3 ...) y luego pedirá la pesa 100 grs. (Weight 100 grs.).
11. colocar la pesa sobre el plato e inmediatamente habrá un conteo hasta llegar a 100 grs. (100.0)
12. Verificar si es 100.0
13. Si no fuera así volver a presionar la tecla MODE y repetir los pasos 9 al 12.
14. Luego presionar TARE
15. Listo para empezar a pesar los medios usando papel cebolla o de mantequilla sobre el plato.
16. Verificar el peso del papel cebolla o de mantequilla
17. Adiciona al peso del material que va a pesar
18. retirar el material pesado
19. Apagar el equipo (apretar botón OFF)
20. Limpiar el plato y alrededor de él.
21. Cubrir el equipo con cobertor
22. Desconectar del toma corriente.





ANEXO N° 8

PRUEBAS BIOQUÍMICAS: RECOMENDACIONES

PRUEBA DE CATALASA

**Reactivo**

Peróxido de hidrógeno 3%

**Recomendaciones**

- Conservar el frasco de peróxido en frasco color caramelo y evitar exponerlo innecesariamente a la luz. De preferencia mantenerlo refrigerado.
- Periódicamente el peróxido de hidrógeno debe ser controlado con cultivos positivos y negativos conocidos, antes de su uso.

PRUEBA DE COAGULASA

**Reactivo.** Plasma de conejo deshidratado

**Recomendaciones**

- Guardar las ampollas, bien cerradas y refrigeradas para mantener su estabilidad. Es recomendable no conservar el plasma reconstituido pasado el día de su uso, pero cuando sea necesario es preferible congelarlo (-20°C) durante algunos días pero siempre se tienen que hacer pruebas de control de calidad antes de su empleo.

PRUEBA DE OXIDASA

**Reactivos**

N,N,N,N, tetrametil-p fenilenediamina, o

N,N, dimetil-p fenilenediamina

Solución acuosa al 1%

**Recomendaciones**

El reactivo puede crear sensibilidad en la piel e inclusive ser carcinogénico.

ANEXO N° 9

ASAS DE SIEMBRA RECOMENDADAS PARA CADA MÉTODO DE MUESTRAS DE URINA

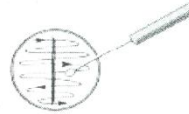
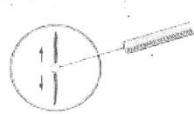
Asas de siembra recomendadas para cada método de muestras de orina

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

(\*) Una colonia = 1000 UFC/mL



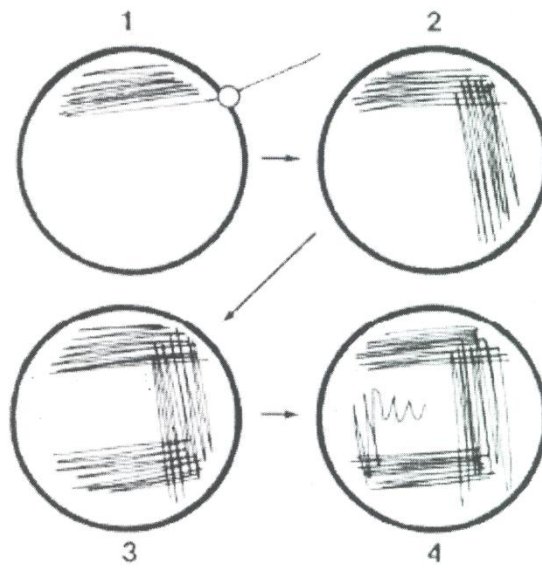
Método para introducir el asa calibrada en la muestra de orina asegurar que se retire la cantidad apropiada.



sin flamear el asa estriar atravesando la línea del inóculo en el sentido de las flechas.

ANEXO N° 10

SIEMBRAS POR DISPERSIÓN AGOTAMIENTO



## ANEXO N° 11

## COLORACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO

## • MÉTODO DE COLORACIÓN DE GRAM

## FIJACIÓN DE LA MUESTRA:

Los frotis pueden ser fijados al calor o con metanol.

## Al calor

- Dejar secar el frotis en una superficie plana.
- Una vez seco pasarlo dos o tres veces por la llama del mechero. No sobrecalentar.
- Dejar enfriar la lámina antes de colorear.

## 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.

## PREPARACIÓN DE COLORANTES

## COLORACIÓN GRAM DE HUCKER

## Cristal violeta

• **Cristal violeta: solución stock**

- Cristal violeta (90 a 95% contenido del colorante) 40.0 g
  - Etanol 95% 400 mL
- Disolver y mezclar  
Almacenar en un frasco oscuro  
Rotular con fecha de un año de expiración  
Almacenar a temperatura ambiente.

• **Solución de oxalato de amonio (1%)**

- Oxalato de amonio (grado reactivo) 16.0 g
  - Agua destilada 1600 mL
- Disolver y mezclar en un frasco oscuro  
Rotular con fecha de un año de expiración  
Almacenar a temperatura ambiente

• **Cristal violeta: Solución de trabajo**

- Solución Stock de cristal violeta 40 mL
- Solución de oxalato de amonio (1%) 160 mL

- Fijar el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando rápidamente el portaobjeto 3 ó 4 veces por la llama del mechero o con metanol y dejar secar.
- Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
- Colorear un minuto y lavar con agua de caño.
- Cubrir la lámina con lugol de Gram durante un minuto. Lavar nuevamente con agua.
- Sostener el portaobjeto entre el pulgar y el índice y bañar la superficie con unas gotas de alcohol acetona hasta no arrastrar más colorante violeta. Generalmente requiere de unos diez segundos o menos.
- Lavar con agua de caño y colocar nuevamente el portaobjeto sobre el soporte.
- Cubrir la superficie con safranina durante un minuto. Lavar con agua de caño.
- Dejar secar la lámina.
- Examinar la lámina coloreada al microscopio con objetivo 100X de inmersión (aceite).

#### COLORACIÓN GRAM – MODIFICACIÓN DE KOPELOFF

##### Cristal violeta alcalino

###### (1) Solución A

Cristal violeta	10.0 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver el colorante en el agua destilada.

Almacenar en un frasco color ámbar. Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente.

###### (2) Solución B: Bicarbonato de sodio

Bicarbonato de sodio	50.0 g
Agua destilada	1000 mL

Disolver el bicarbonato en el agua. Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente.

##### Solución de Lugol

Hidróxido de sodio

Agua destilada

Cristales de yodo

Yoduro de potasio

Agua destilada

Disolver el hidróxido de sodio en 25 ml de agua destilada en un frasco oscuro.

Agregar el yodo, yoduro de potasio y disolverlos bien.  
Gradualmente agregar 975 ml de agua destilada, mezclando bien después de cada adición.

**Precaución:**

El yodo y yoduro de potasio son corrosivos. Evitar la inhalación, ingestión o contacto con la piel.

**Decolorante**

Etanol 95% 700 mL  
Acetona 300 mL

Combinar y mezclar en un frasco color ámbar. Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente.

**Precaución:**

El etanol y la acetona son inflamables.

**Colorante de Contraste. Safranina**

Safranina O, certificada 20.0 gr.  
Etanol 95% 100 mL  
Agua destilada 1000 mL

En un frasco de un litro agregar solo suficiente etanol para disolver la safranina (aproximadamente 50 mL). Agregar agua destilada a la solución de safranina.

Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente.

**Procedimiento de la coloración:**

- Cubrir el frotis con la solución A. Agregar aproximadamente 5 gotas de la solución B.
- Colorear 2 – 3 minutos cuidando que no se seque.
- Enjuagar completamente con la solución de lugol y descartar.
- Agregar más solución de lugol para que cubra la lámina y dejarlo por 2 minutos.
- Manteniendo la lámina en posición inclinada agregar el decolorante y enjuagar inmediatamente.
- Colorear con safranina al menos 30 segundos.
- Enjuagar con abundante agua de caño.
- Dejar secar.

## COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN

Las bacterias se tiñen con carbolfucsina y resisten decolorantes potentes como el alcohol ácido, se denominan alcohol ácido resistentes, mientras otras se decoloran y se tiñen posteriormente con el colorante de contraste azul de metileno.

### Reactivos

- a) Carbolfucsina: Fucsina básica pulverizada 5 grs.  
Fenol: 25 grs.  
Alcohol etílico 35%; 50 ml.  
Água destilada, 500 ml.

Disolver la fucsina en el alcohol y añadir el fenol previamente disuelto, todo en baño de agua hirviendo, finalmente agregar el agua destilada.

- b) Alcohol ácido: Alcohol etílico 95%; 97 ml.  
Ácido clorhídrico concentrado, 3 ml.
- c) Azul de metileno: Azul de metileno; 3 grs.  
Água destilada; 100 ml.

### Procedimiento para la coloración

- a) Fijar por calor la muestra extendida en la lámina.
- b) Aplicar la carbolfucsina cubriendo toda la extensión. Por debajo de la lámina colocar un mechero de alcohol y calentar, de modo que se observe la presencia de vapores en tres oportunidades (no producir ebullición). Dejar 5 minutos con el colorante.
- c) Lavar con agua y decolorar la lámina con alcohol ácido hasta que no se observen restos de color rojo (1 a 2 minutos).
- d) Lavar con agua y colorear con azul de metileno por 1 minuto.
- e) Lavar con agua, dejar secar y observar con objetivo de inmersión.

### **COLORACION DE AZUL DE METILENO**

Para observar morfología de las bacterias, gonococo bacilo diftérico, LCR.

#### Reactivos

Azul de metileno 3.0 gr.

Agua destilada 1000 mL

#### Procedimiento

Fijar la lámina por el calor

Añadir el colorante y dejar por 1 – 3 minutos

Lavar con agua y observar con aceite de cedro

#### Resultados

Las bacterias se tiñen de azul.

### **COLORACION DE CAPSULAS**

#### Reactivos

a) Colorante de eosina

Eosina soluble en agua : 1 gr.

Suero humano 25 ml.

Agua destilada 100 ml.

Tinol 1 cristal

Dejar la mezcla en reposo 3 días

Centrifugar y obtener el sobrenadante

b) Carbofucsina de Ziehl Neelsen diluida 1:5 con H<sub>2</sub>O destilada.

#### Procedimiento

° Sobre el extremo de una lámina colocar una gota de carbofucsina diluida con una gota de caldo de cultivo de la bacteria a investigar y dejar en reposo 30 segundos.

° Añadir una gota del colorante de eosina y dejar 1 minuto.



- Con la ayuda de otra lámina hacer un frotis como para Hmg (hemograma) y dejar. Observar con aceite de cedro.

#### Resultado

Las bacterias y el fondo de la lámina se tiñen de color rojo, las cápsulas se observan como halos claros alrededor de las bacterias.

### MEDIOS: PREPARACIÓN Y RECOMENDACIONES

#### **AGAR CITRATO DE SIMMONS**

- Preparar de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Colocar aproximadamente 4 a 5 mL en cada tubo.
- Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup> por 15 minutos.
- Dejar que el medio solidifique en posición inclinada, con poca profundidad en pico de flauta.
- Refrigerar para su conservación (4 – 10°C).

#### **AGAR KLIGLER Y AGAR HIERRO TRIPLE AZUCAR**

- Preparar ambos medios de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Distribuir aproximadamente 5 mL en tubos de 13 x 100 preferentemente.
- Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup> por 15 minutos.
- Enfriar en posición inclinada (pico de flauta) con una capa basal profunda.

#### **AGAR LISINA HIERRO**

- Preparar de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup> por 15 minutos.
- Distribuir aproximadamente 5 mL en tubos de 13 x 100. Dejar enfriar en posición inclinada, para producir una columna de aproximadamente 3 cm. de altura y sobre ella, una superficie inclinada de por lo menos la misma longitud.

#### **AGAR UREA DE CHRISTENSEN: Producción de ureasa**

- Medio: Agar urea de Christensen
  - Preparar de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
  - Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup> por 15 minutos. Enfriar hasta 50°C.
  - Asépticamente agregar al agar 100 mL de urea estéril.
  - Distribuir el medio asépticamente en tubos estériles, aproximadamente 4 mL por tubo.

- Solidificar en posición inclinada formando un pico de flauta largo, con la capa profunda reducida.
- Conservar en refrigeración (4 – 10°C).
- Urea:
  - Pesar 20 g en 100 mL de agua destilada o desmineralizada.
  - No calentar la solución. Esterilizar por filtración (utilizar filtro de membrana Millipore, diámetro del poro 0.45 µm).
  - De no contar con los filtros se puede esterilizar la urea por tindalización.

**CALDO DESCARBOXILASAS: Caldo descarboxilasa de Moeller**

- Preparar el medio de acuerdo a las instrucciones del fabricante
- Para determinar la actividad descarboxilasa de un determinado aminoácido, se agrega al caldo base en concentración de 1% (L (+) lisina, o L(+) ornitina, o L (+) arginina).
- Generalmente no es necesario ajustar el pH cuando se emplea L arginina o L lisina, pero con la L ornitina hay que hacer el ajuste antes de la esterilización. El pH final debe ser de  $6.8 \pm 0.2$ .
- Repartir en tubos de 4 mL a 5 mL en tubos de tapa rosca y autoclavar.
- Conservar refrigerado (4 – 10°C).

**CALDO MR VP**

**Prueba de rojo de metilo**

**Reactivos**

- Indicador de pH rojo de metilo:

Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol etílico 95°	300 mL
Agua destilada	200 mL

Disolver el rojo de metilo en el alcohol  
Agregar el agua destilada a la mezcla anterior  
Guardar el reactivo refrigerado
- Medio MR VP  
Preparar el medio de acuerdo a las indicaciones del fabricante.  
Calentar suavemente hasta su disolución  
Distribuir aproximadamente 5 mL en tubos (13 x 100 de preferencia)  
Autoclavar a 12°C, 15 libras/pulg<sup>2</sup>, 15 minutos  
Conservar refrigerado 4 a 10°C.

**Recomendaciones**

La peptona del medio puede afectar los resultados de la prueba, por eso es importante realizar el control de calidad utilizando las cepas de control.

### Prueba de Voges – Proskauer

#### Medios y reactivos

- Medio MR VP
  - Preparar el medio de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
  - Distribuir aproximadamente 5 mL en tubos (13 x 100 de preferencia)
  - Autoclavar a 121°C, 15 libras/pulg<sup>2</sup>, 15 minutos
  - Conservar refrigerado 4°C a 10°C.
- α naftol al 5%
- KOH al 40%

#### MEDIO DE GELATINA NUTRITIVA: Prueba de licuefacción de la gelatina

- Preparar siguiendo las indicaciones del fabricante
- Distribuir aproximadamente de 4 mL a 5 mL por tubo.
- Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup>, 15 minutos.
- Enfriar en posición vertical, ajustar las tapas y refrigerar a 4 – 10°C.
- Conservar los tubos con gelatina refrigerados hasta el momento de su inoculación.

#### PRUEBA DE INDOL

##### Medios y reactivos:

- Caldo de triptófano o de peptona o caldo de tristona.
  - Preparar de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
  - Distribuir en tubos, aproximadamente 4 mL por tubo.
  - Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup>, 15 minutos.
  - Conservar refrigerado.
- Reactivo de indol de Kovacs
  - Alcohol amílico o isoamílico(puede sustituirse por alcohol butílico) 150mL
  - P-dimetilamino-benzaldehído 10g
  - HCl concentrado 50mL

##### Procedimiento

- Disolver el aldehído en el alcohol.
- Agregar el ácido lentamente a la mezcla aldehído – alcohol.
- Guardar en frascos oscuros y en refrigeración.
- Si el cultivo de 24 horas es negativo, deberá incubarse otras 24 horas y repetirse la prueba.
- Antes del empleo de los reactivos, deben ser controlados con cultivos positivos y negativos conocidos, por ejemplo *Escherichia coli* y *Klebsiella*.
- Conservar refrigerados los reactivos y hacer un control de calidad semanal.

##### Recomendaciones

El reactivo de Kovacs debe mantenerse refrigerado a 4° - 10°C en un frasco ámbar con tapa de vidrio. Si se deja a temperatura ambiente durante un tiempo, cambiará de color y se hará menos sensible.

## PRUEBA DE MOTILIDAD

### Medio

Se emplea medios semisólidos que se obtienen comercialmente (Agar movilidad, SIM, MIO).

### Procedimiento

- Preparar el medio de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup>, 15 minutos.
- Distribuir aproximadamente 5 mL por tubo. Solidificar el medio en posición vertical y conservar refrigerado (4°C – 10°C).

## PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NITRATO

### Medios y Reactivos

#### • Caldo Nitrate

- Preparar de acuerdo a las instrucciones del fabricante
- Repartir 1 mL por tubo.
- Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup>, 15 minutos.
- Conservar los medios refrigerados a 4°C – 10°C.

#### • Reactivo A:

- $\alpha$ -naftilamina 5.0 g
- Dimetil- $\alpha$  naftilamina 6.0 g
- Ácido acético (5N), 30% 1000 mL

#### Procedimiento

- Disolver cualquiera de las sustancias en menos de 1000 mL de ácido acético 5N por medio de un suave calentamiento.
- Pasar la solución a un frasco volumétrico de 1 litro y completar a 1000 mL con el ácido acético 5N.
- Filtrar la solución.
- Guardar refrigerado (4°C) en un frasco ámbar.

#### • Reactivo B:

- Ácido sulfanílico (ácido para aminobenzenosulfónico) 8.0 g
- Ácido acético (5N), 30% 1000 mL

#### Procedimiento

- Disolver el ácido sulfanílico en menos de 1000 mL de ácido acético 5N.
- Traspasar la solución a un frasco volumétrico de un litro y agregar ácido acético 5N c.s.p. 1000 mL y guardar refrigerado (4°C) en un frasco ámbar.
- Ambos reactivos se mantienen estables por lo menos tres meses.

### AGAR BILIS ESCULINA

Se prepara el medio de acuerdo a las indicaciones del fabricante, calentando suavemente la solución.

- Colocar 5 mL aproximadamente en un tubo con tapa de rosca (16 mm x 125 mm).
- Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg<sup>2</sup>, 15 minutos.
- Enfriar manteniendo el tubo inclinado de tal manera que se obtenga una buena superficie en pico de flauta).
- Conservar refrigerado (4°C – 10°C).

### CALDO PARA LAS PRUEBAS DE CARBOHIDRATOS

#### Medios y reactivos

- Caldo infusión corazón
- 10% de carbohidrato en agua
- Púrpura de bromocresol (1,6% en etanol 95%)
- Repartir 3 mL en cada tubo de 12 mm x 75 mm con tapa de rosca y autoclavar a 121°C x 10 minutos.
- Conservar los medios en refrigeración (4°C – 10°C).

### MEDIOS PARA HEMOCULTIVOS

#### MEDIO MNONOFÁSICO

#### Materiales y medios:

Caldo tripticase soya o infusión cerebro corazón

Polyanetol sulfonato de sodio (SPS)

Gelatina

Frascos de vidrio de 150 mL ó 125 mL

Tapones de jebe

Precintos

#### Preparación

- Preparar el caldo de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Agregar gelatina a una concentración final de 1,2%
- Agregar polianetol sulfonato de sodio (SPS) a una concentración de 0.025 – 0.05%, mezclar.
- Distribuir 90 mL en frascos de 150 mL y 45 mL en frascos de 125 mL.
- Colocar el tapón de jebe y asegurarlo con cinta mask in tape para evitar que debido a la presión los tapones se salgan.
- Se esteriliza por autoclave a 121°C a 15 lb de presión x 15 minutos.
- Una vez frío retirar la cinta mask in tape

- Asegurar los tapones de jebes y colocar precintos de seguridad. Realizar este procedimiento en una cabina de flujo laminar o cerca de un mechero de bunsen.
- Se realiza el control de esterilidad: incubar los medios a 35 – 37°C por 24 – 48 horas.

#### MEDIO BIFÁSICO

- **Materiales**

Frascos de vidrio  
Tapones de jebes  
Precintos

- **Fase Sólida**

Agar BHI o TSA  
Agar agar:  
Preparar de acuerdo a las instrucciones del fabricante agregando agar agar en una concentración final de 1%.

- **Fase Líquida**

Caldo tripticase soya o infusión cerebro corazón  
Polyanetol sulfonato de sodio  
Gelatina

- Preparar el caldo de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Agregar gelatina a una concentración final de 1,2%
- Agregar polianetol sulfonato de sodio (SPS) a una concentración final de 0.025 – 0.05%
- Distribuir 45 mL en frascos de 150 mL y 20 mL en frascos de 125 mL.

- **Preparación**

- Se reparte 25 mL de agar en los frascos y se esteriliza.
- Se deja solidificar en posición inclinada.
- Agregar el caldo asépticamente, al medio solidificado
- Colocar los tapones de jebes y los precintos de metal.
- Se controla la esterilidad del medio por una semana a 35°C – 37°C.

#### Prueba de Hipurato

La presencia de cloruro férrico precipita Hipurato y benzoato.

- A. Caldo de Hipurato 1%  
Hipurato de sodio 1.0 gr.  
Caldo B H I 100 ml.  
(cérebro, corazón, infusión).

Preparación

Preparar el caldo B H I y luego agregar el hipurato de sodio. Mezclar, colocar en tubos de 13 x 100 3 ml del caldo y esterilizar por autoclave 121° C por 15 minutos.

- B. Inocular el caldo Hipurato con la bacteria (presunto estreptococo) incubar 35° C por 24 horas.  
Luego centrifugar el medio para empacar las células.  
Transferir 0.8 ml. del sobrenadante a un tubo estéril.  
Agregar 0.2 ml de reactivo (2 ml HCl QP; 98 m H<sub>2</sub>O destilada; 12 gr. Cloruro férrico FeCl<sub>3</sub> + 6 H<sub>2</sub>O).  
Mezclar, observar por 15 minutos.
- C. Lectura: Precipitación después de 15 minutos ⇒ +  
Control: Incluir tubo no inoculado (repetir paso B).

Prueba de DNASA

DNA → ácido desoxirrebonucleico	2 mg/ml	10 mg.
Agar TSA cantidad a preparar		2.0 gr.
0.8 mg/ml Cl Ca		<u>400 ml</u>
		50 mL H <sub>2</sub> O d.d.

pH: 7.3

Preparar el agar TSA; agregar DNA y luego incorporar Cl Ca.  
Autoclavar 15 minutos a 121° C, repartir en placas pequeñas.

**Nota:** Repartir en placas pequeñas (a identificar 1 por bacteria). Al usar dividir en 4 si usa placas de 100 cm.

Prueba Super oxol 30%

Agua destilada 70 ml estéril  
Agua oxigenada 30 ml.  
Mezclar y guardar en frasco ámbar.

**Nota:** Este reactivo se usa solo para *Neisseria gonorrhoeae*.

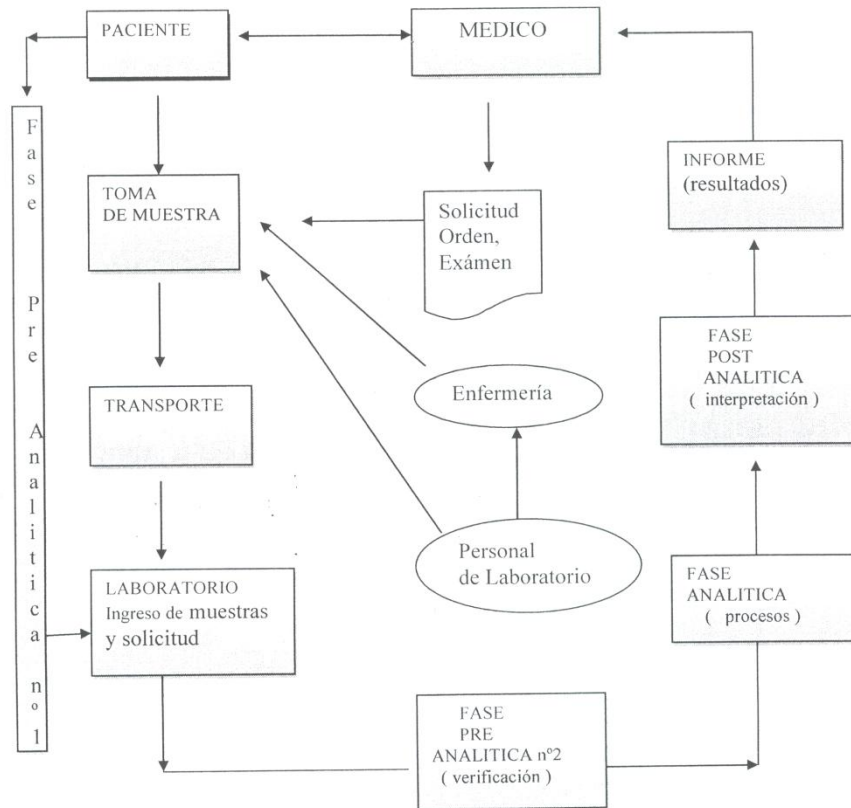


# FLUXOGRAMAS

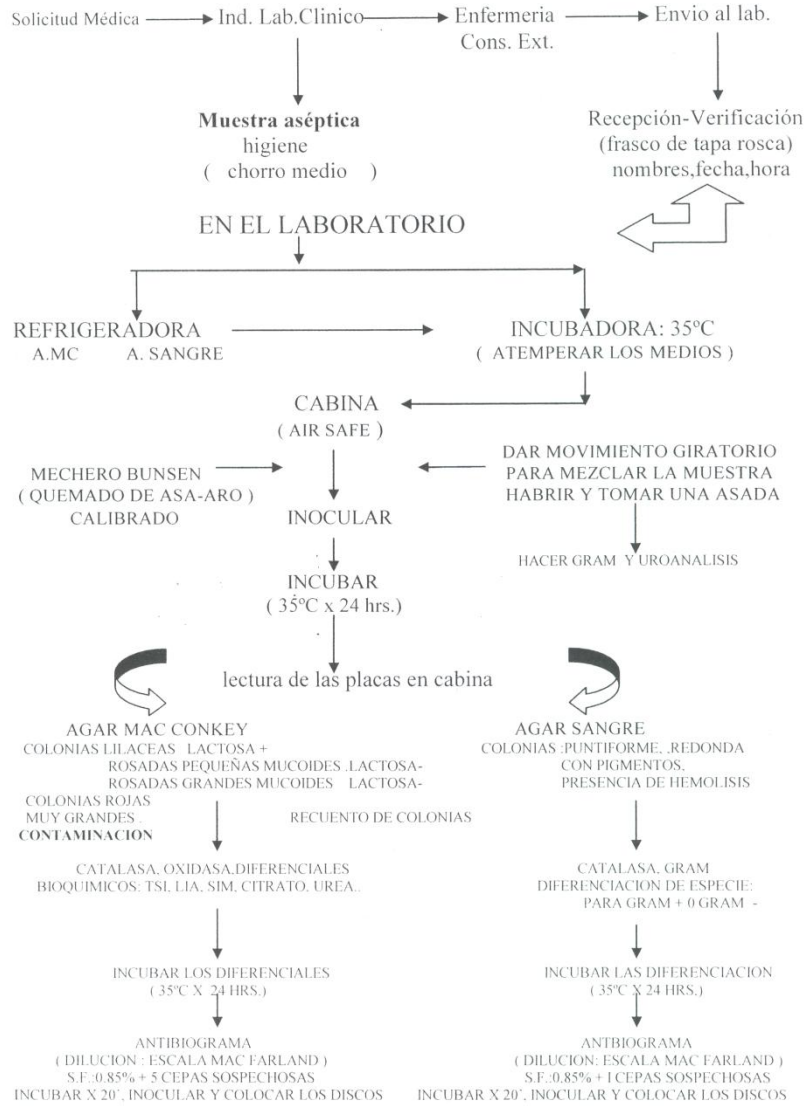




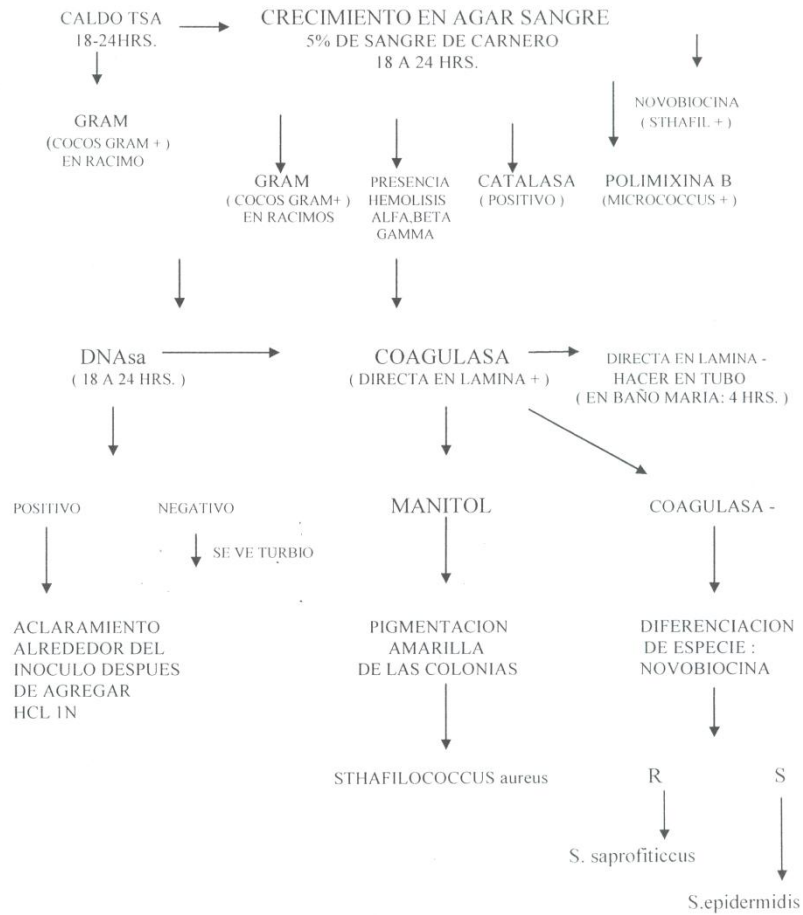
FLUXOGRAMA BACTERIOLÓGICO



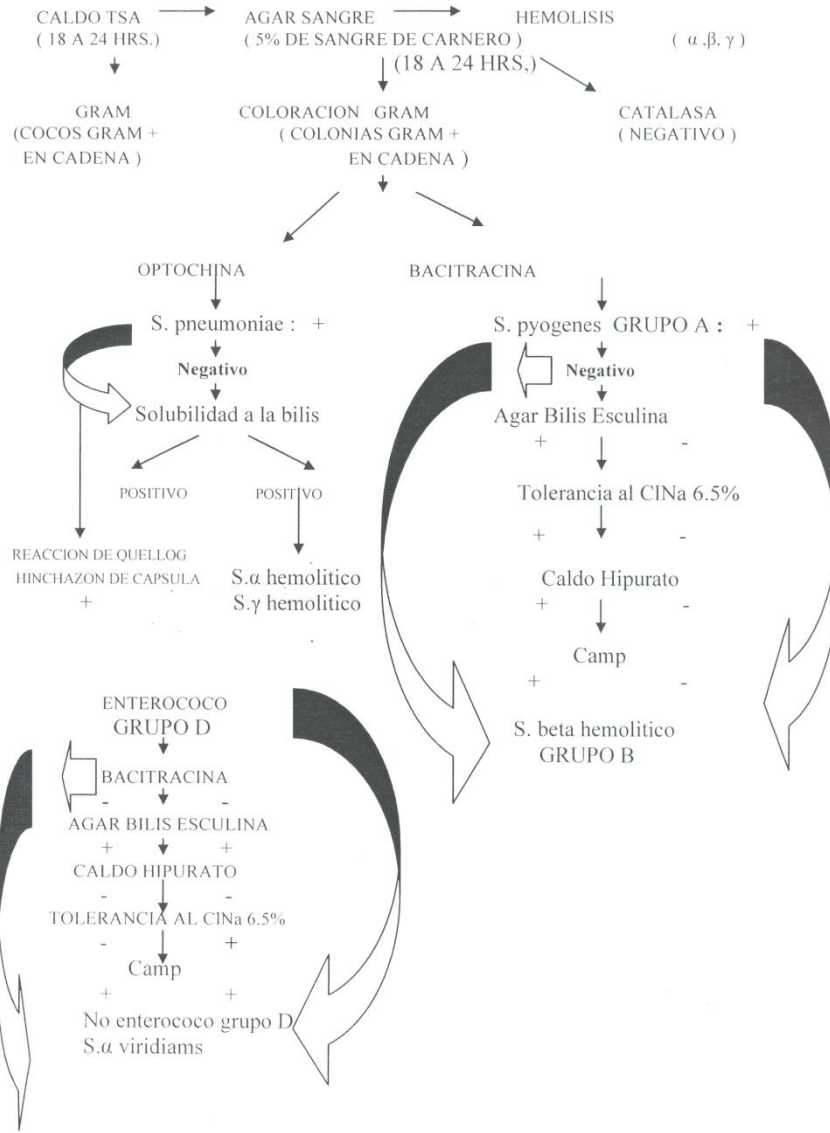
**UROCULTIVO**



### SECRECIONES STAFILOCOCCUS SPP.

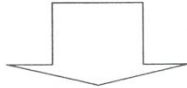


**SECRECIONES: STREPTOCOCCUS SPP.**

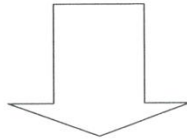


SECRECIONES: NEISSERIA gonorrhoeae

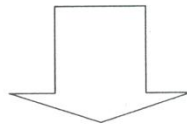
HISOPO CON MUESTRA



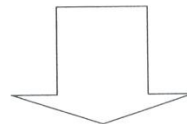
SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVO  
THAYER MARTIN



INCUBACION A 37°C x 18 a 72 hrs.  
5 a 10% CO  
70 % A 80% HUMEDAD



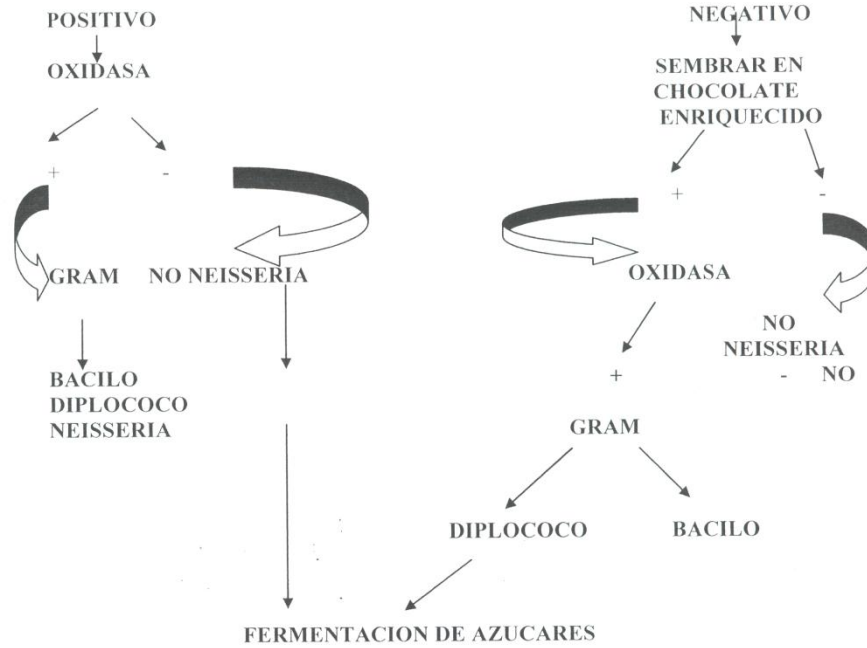
COLONIAS SOSPECHOSAS  
OXIDASA, CATALASA, GRAM



ENVIO AL LAB. REFERENCIAL  
MAGDALENA DEL MAR



SECRECIONES: IDENTIFICACION DE NEISSERIA  
 CRECIMIENTO EN THAYER MARTIN



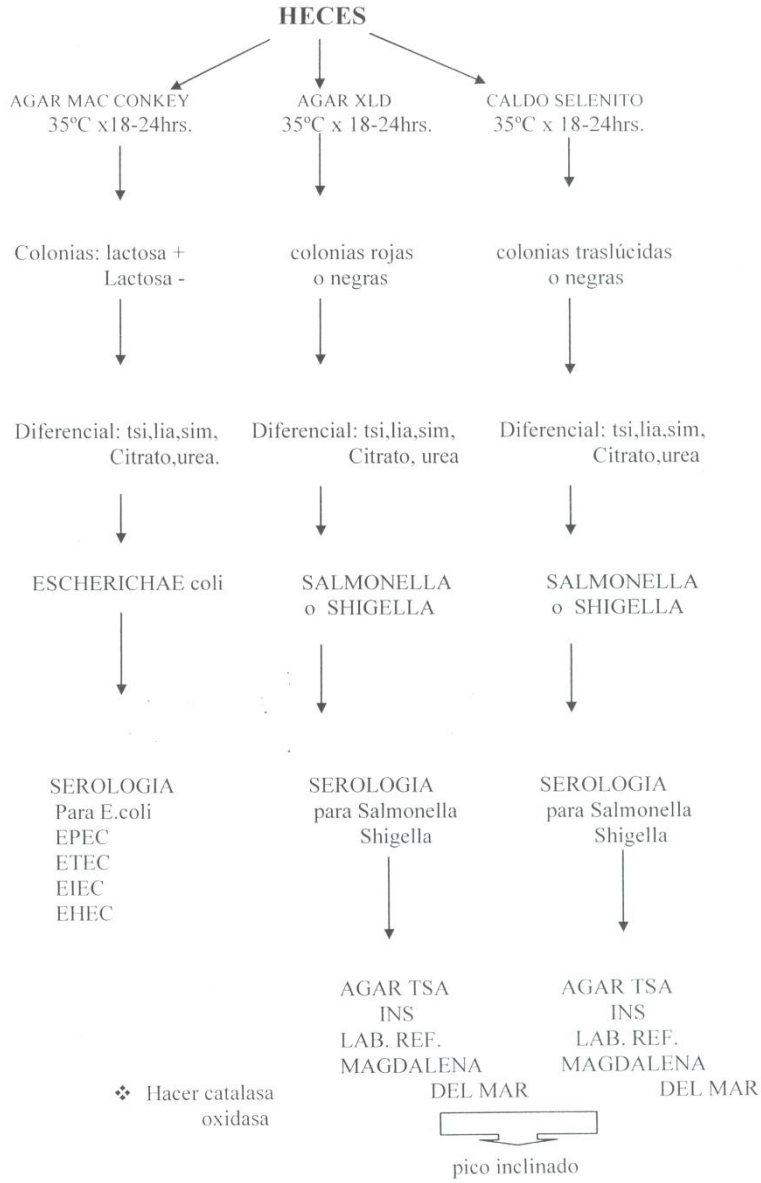
	SUCROSA	GLUCOSA	LACTOSA	MALTOSA
NG	-	+	-	-
NM	-	+	-	+
NL	-	+	+	-

CATALASA  
 N. GONORREA +  
 N. MENINGITIDIS -  
 N. LACMICO -

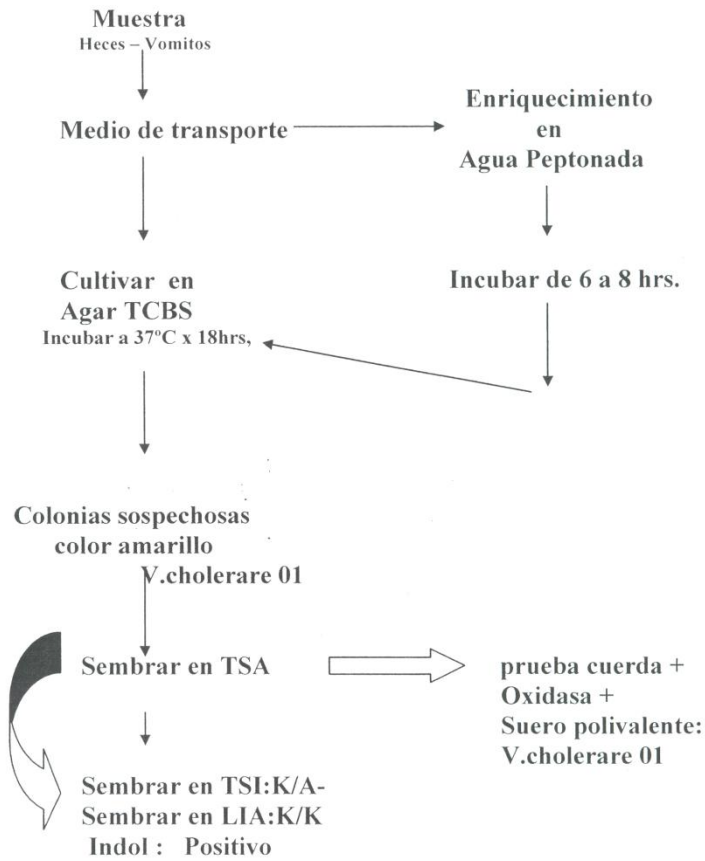
SEROLOGIA  
 +  
 - ( MORACELLA )

*[Handwritten signature]*



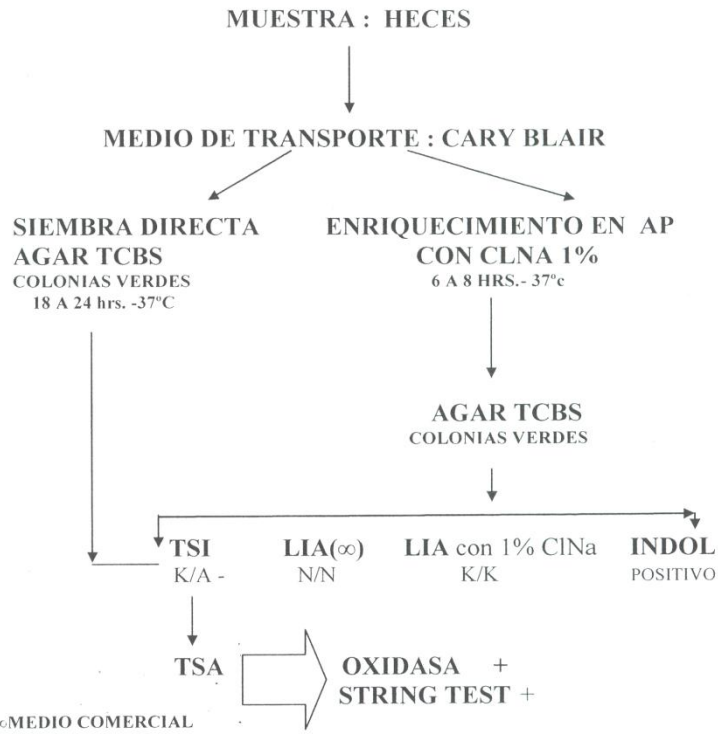


**VIBRIO cholerae**



**Vibrio parahemolyticus**





OBSERVAR CRECIMIENTO EN AP ALCALINA A DIFERENTES [ ] DE CLNA  
INCUBAR 6-8 HRS. A 37°C

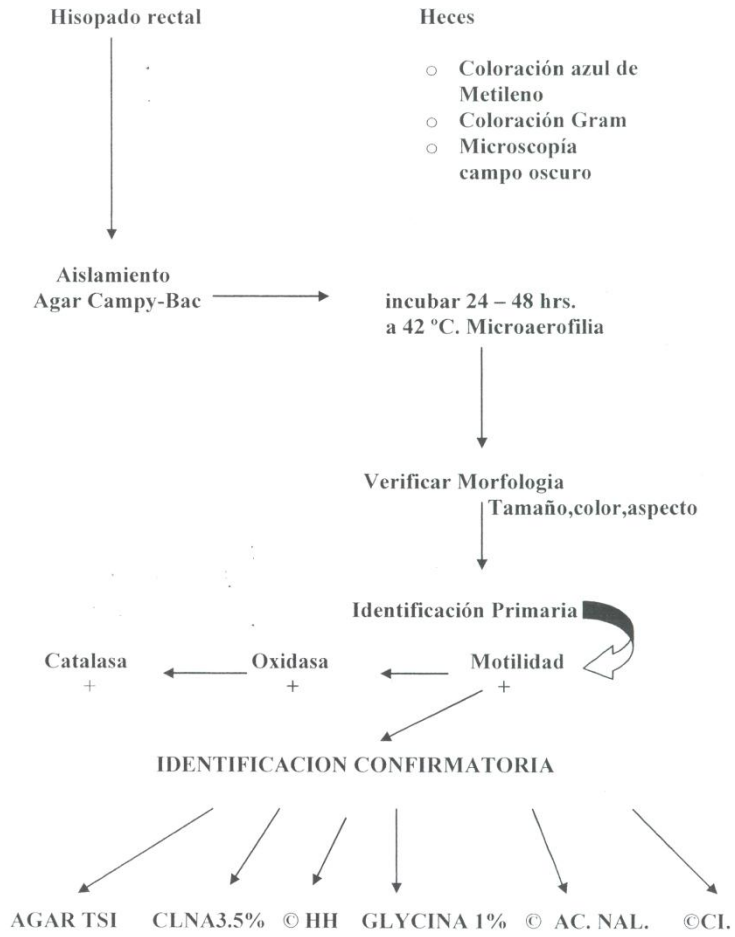
0% CLNA	3% CLNA	7% CLNA	10% CLNA
+	+	+	+

OTRAS PRUEBAS BIOQUIMICAS (+)

ARGININA	ORNITINA	LISINA	GELATINA	VP 37°C	SACAROSA
-	+(-)	+	+	-	-
MANITOL	MANOSA	INOSITOL	ARABINOSA	PEROXIDO	GLUCOSA
+	+	-	-	+	+

A ESTOS MEDIOS SE LES A AGREGADO 1% DE CLNA

CAMPYLOBACTER



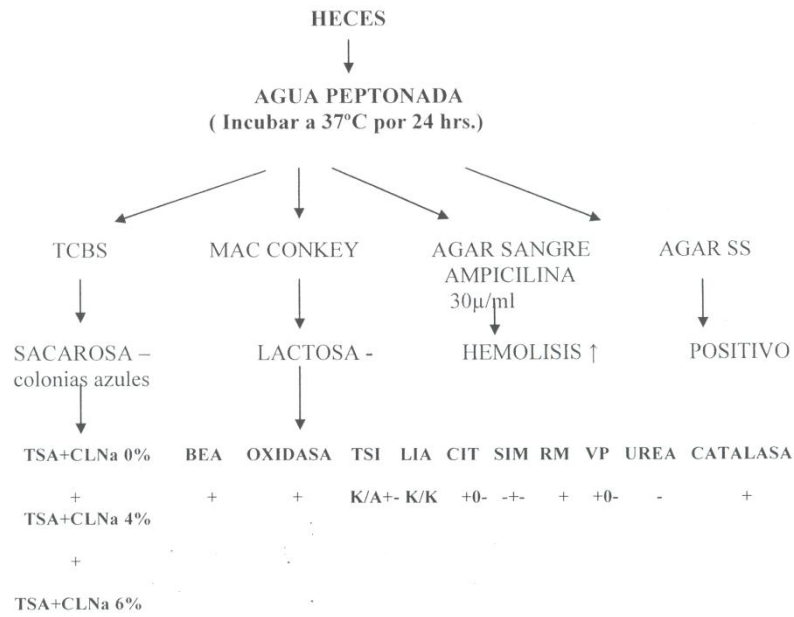
©Susceptibilidad al Acido Nalidixico y a la Cefalotina  
Hidrólisis del Hipurato



PRUEBAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACION CONFIRMATIVA  
DE ESPECIES DE CAMPYLOBACTER

PRUEBA	C. jejuni	C. coli	C.lari
OXIDASA	+	+	+
CATALASA	+	+	+
MOTILIDAD	+	+	+
AC.NALIDIXICO (AC. NAL)	S	S	R
CEFALOTINA ( CL )	R	R	R
CRECIMIENTO : TSI : GLUCOSA LACTOSA H2S	- - -	- - -	- - -
CRECIMIENTO: GLYCINA 1% CLNA 3.5%	+ -	+ -	+ -
CRECIMIENTO 25°C 36°C 42°C	- + +	- + +	- + +
HIDRÓLISIS HIPURATO	+	-	-

**AEROMONAS**



DEXOSICOLATO DE SODIO AL 0.5% ( PRUEBA DE LA CUERDA )

+

DISCO BACTERIOSTATICO O/129

RESISTENTE: R

ANTIBIOGRAMA:

PENICILINA : RESISTENTE ( R )  
 AMPICILINA : RESISTENTE ( R )  
 CEFAZOLINE, CEFUROXIME, CEFOTAXIME, GENTAMICINA, TOBRAMICINA, CIPROFLOXACINO, COTRIMOXAZOL, EMIPENEN: SENSIBLE ( S ).

667



## PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA

## AEROMONAS hydrophila

GAS DE GLUCOSA	V	72%
BETA HEMOLISIS	V	72%
GLUCOSA	+	97%
XYLOSA	-	1%
MANITOL	+	100%
MALTOSA	+	99%
CATALASA	+	97%
OXIDASA	+	99%
CRECIMIENTO EN MAC CONKEY	+ lactosa negativa 100%	
CRECIMIENTO EN AGAR SS	+	97%
CITRATO DE SIMONS	V	52%
UREA CHRISTENSEN	-	2%
REDUCEN NITRATO	+	97%
INDOL	+	92%
GELATINA	+	96%
LYSINA	V	17%
ARGININA	+	97%
ORNITINA	-	0%
TSI	K/A +-	
LIA	K/A	
H2S ( TSI )	-	0%



PLESIOMONAS

HECES



AGUA PEPTONADA  
( Incubar a 37°C ) x 24 hrs.



TBCS  
sacarosa -

MAC CONKEY  
lactosa -

AGAR SANGRE+AMPICILINA  
color grisáceo, con o sin hemólisis



Tolerancia CINa 1%  
Tolerancia CLNa 4%  
Tolerancia CLNa 6%



SIM	DNAsa	OXIDASA	TSI	LIA	INDOL	RM	VP	CIT	U	CATALASA
---	+	+	k/A—K/K	-	-	-	-	-	-	+
			A/A—K/N							

ANTIBIOGRAMA:

- Clorafenicol: S
- Cotrimozasol : S
- Ceftriazone :S
- Gentamicina : S
- Dibekacina : S
- Cefoperazona: S

TM. JMGR/2010



# REGISTROS



MINISTERIO DE SALUD



HOSPITAL VICTOR LARCO HERRERA  
SERVICIO DE APOYO AL DIAGNOSTICO  
SERVICIO DE LABORATORIO CLINICO



CONTROL DIARIO DE TEMPERATURA

RESPONSABLE :  
RANGO DE TEMPERATURA:  
MES:                      AÑO :

Fecha	Hora	Temperatura del equipo 1º lectura	Hora	Temperatura del equipo 2º lectura	Firma del responsable	Observac.

Fecha de limpieza diaria:

TM: jmgr/microb/07/08

*jmgr*







MINISTERIO DE SALUD

AREA: SAD-LAB  
MICROBIOLOGIA  
MODELO : ALL AMERICAN  
HEAT UP: 20-25 minutos  
PRESION:20 PSI T°C: 259°F

REGISTRO DE TEMPERATURA  
DE AUTOCLAVE 25X - CODIGO :32220250004  
MES: AÑO:

FECHA	1 ra HORA DE ENCENDIDO	TIEMPO DE SALIDA - VAPOR	2da HORA DE TRABAJO	RESPONSABLE

LIMPIEZA DIARIA

--	--	--	--	--

TMJmgr/microb/07/08





MINISTERIO DE SALUD  
HOSPITAL VICTOR LARCO HERRERA

FICHA DE MANTENIMIENTO DIARIO DE CABINA DE BIOSEGURIDAD

CODIGO:53221073001 MARCA:ESCCO -ACCH SERIE:2006 - AREA:SAD-LAB  
CLASE II -STREAM MES: AÑO: 18880 MICROBIOLOGIA

FECHA	HORA:ENCENDIDO 1	HORA:ENCENDIDO 2	TIEMPO DE USO	VERIFICAR LUZ UV FLUORESCENTE	FIRMA: RESPONSABLE

LIMPIEZA DIARIA CON ESPONJA Y SECADO CON PAPEL TOALLA  
NO USAR ALGODON ( DAÑA EL FILTRO HEPA )

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

TMJmgr/microb/07/08









MINISTERIO DE SALUD  
 HOSPITAL VICTOR LARCO HERRERA

FICHA DE MANTENIMIENTO: USO DE BALANZA DIGITAL  
 CODIGO: 60220634007 MARCA: BOSCH SERIE:CE96 AREA: SAD-LAB  
 RANGO DE PESO: 0 grs. a 600grs. MODELO:EP600-D-72417 MICROBIOLOGIA

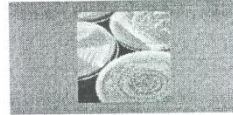
FECHA	HORA	CALIBRACION	PRODUCTO A PESAR	LIMPIEZA DE PLATO	FIRMA: RESPONSABLE	OBSERVACION

NOTA: DESCONECTAR EL INTERRUPTOR AL TERMINO DEL PROCEDIMIENTO, POR TENER TRANSFORMADOR. NO DEJARLO ENCENDIDO EL EQUIPO.

TM:JMGR/MICROB/07/08

*Handwritten signature*





MINISTERIO DE SALUD  
HOSPITAL VICTOR LARCO HERRERA

REGISTROS DE PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVOS

FEDHA	MEDIO	USO	UNIDAD	MARCA	LOTE	F.VENC	PH	T°C	QC 35°C

NOTA: DESPUES DE PREPARAR Y AUTOCLAVAR LOS MEDIOS ,REPARTIR EN CABINA BIOLOGICA, ROTULAR, Y COLOCARLOS EN INCUBADORA PARA QC, DURANTE 24 HORAS. LUEGO GUARDARLOS CON LA BASE DEL PLATO (PLACA PETRY ) HACIA ARRIBA DENTRO DE BOLSA CHEQUERAS, ASI SE EVITARA EL INGRESO DE VAPOR DE AGUA .

TM:JMGR/MICROB/07/08

