

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BACTERIOLOGICOS EN INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS

Elaboración:

*Rosa Sacsquispe Contreras
Biólogo
Laboratorio de Bacteriología Especial
Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud*

*Gladis Ventura Egúsqüiza
Biólogo
Laboratorio de Bacteriología Especial
Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud*

COLABORARON EN LA REVISIÓN Y VALIDACIÓN DEL MANUAL

Hospital Nacional Docente Madre-Niño San Bartolomé

Dr. Augusto Valencia Ramírez

Hospital Nacional del Callao Daniel A. Carrión

Dr. José María Guevara Granados

Instituto Nacional de Salud

Dr. Víctor Suárez Moreno

Dr. César Cabezas Sánchez

Instituto Nacional del Niño

Dr. Rito Zerpa Larraurri

Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

Dra. María Elena Silva Díaz

Proyecto VIGIA-MINSA

Dr. Martín Yagui Moscoso

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Dr. Humberto Guerra Allison

COMITÉ EDITOR

Dr. César Cabezas Sánchez

Dr. César Náquira Velarde

Dr. Zuño Burstein Alva

M.Sc. Silvia Seraylán Ormachea

Blg. Yvonne Torres de Yon

Catalogación hecha por el Centro de Documentación e Información del INS

Instituto Nacional de Salud (Peru)
Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias / INS --
Lima : Ministerio de Salud, INS, 2001.
89 p. -- (Serie de Normas Técnicas; 28)

1. INFECCION HOSPITALARIA/diagnóstico 2. INFECCION
HOSPITALARIA/normas. 3. INFECCION HOSPITALARIA/microbiología
4. INFECCIONES BACTERIANAS.
I. Perú. Ministerio de Salud

ISBN : 9972-357-11-5

Hecho el depósito legal N° 1501052001-1693

© Ministerio de Salud, 2001

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Telf. 431- 0410

© Instituto Nacional de Salud, 2001

Cápac Yupanqui No. 1400, Jesús María, Lima 11,

Teléfono: 471-9920, Fax: 471-0179

e-mail: postmaster@ins.sld.pe

Página Web: www.ins.sld.pe

Esta publicación fue realizada gracias al apoyo financiero del Proyecto "Enfrentando las Amenazas de las Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes" (Convenio de Cooperación entre el Ministerio de Salud del Perú y la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional, USAID)



CONTENIDO

INTRODUCCION	IV
SECCION 1: GENERALIDADES	1
1.1 OBJETIVO	1
1.2 CAMPO DE APLICACIÓN	1
1.3 RESPONSABILIDADES	1
1.4 DOCUMENTOS DE REFERENCIA	2
1.5 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	2
1.6 CONDICIONES GENERALES PARA LA OBTENCION Y MANEJO DE MUESTRA	4
SECCION 2: MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	5
SECCION 3: PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE MUESTRA.	6
3.1 OBTENCION DE MUESTRA DE SANGRE PARA CULTIVO	6
3.2 OBTENCION DE MUESTRA DE DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES	7
3.3 OBTENCION DE MUESTRA DE ORINA PARA CULTIVO	8
3.4 OBTENCION DE MUESTRA DE HERIDA OPERATORIA	11
3.5 OBTENCION DE MUESTRAS DE SECRECIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR	13
3.6 OBTENCION DE MUESTRA DE SECRECION ENDOMETRIAL PARA CULTIVO	14
SECCION 4: ENVIO Y TRANSPORTE DE MUESTRA	16
4.1 OBJETIVO	16
4.2 CONDICIONES GENERALES	16
4.3 PROCEDIMIENTO	16
4.4 CRITERIOS PARA RECHAZAR UNA MUESTRA	18
SECCION 5: PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO	19
5.1 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE ORINA	19
5.2 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HEMOCULTIVO	22
5.3 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE PUNTA DE DISPOSITIVO INTRAVASCULAR	24
5.4 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HERIDA OPERATORIA	25
5.5 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR	26
5.6 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA EN CASOS DE ENDOMETRITIS	30
SECCION 6: IDENTIFICACION BACTERIANA	31
6.1 IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: <i>Staphylococcus y Enterococcus</i>	31
6.2 IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES: <i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter</i>	43
6.3 IDENTIFICACION DE BACILO GRAM NEGATIVO NO FERMENTADOR: <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	56
SECCION 7: PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE DISCO DIFUSION	64
SECCION 8: CONTROL DE CALIDAD	64
SECCION 9: REGISTROS	65
BIBLIOGRAFIA	67

Tabla 1	Condiciones óptimas de la muestra para su Procesamiento, Transporte y Almacenamiento	17
Tabla 2	Asas de siembra recomendadas para cada método de muestras de orina	20
Tabla 3	Principales características fenotípicas de las especies de <i>Staphylococcus</i> comúnmente aislados en infecciones	36
Tabla 4	Principales características fenotípicas de Cocos Gram positivos en cadena, catalasa negativos	38
Tabla 5	Principales características fenotípicas usadas para la identificación de <i>Enterococcus</i> de mayor importancia clínica y géneros relacionados	41
Tabla 6	Principales características bioquímicas de <i>Escherichia spp</i>	50
Tabla 7	Principales características bioquímicas de <i>Klebsiella spp</i>	54
Tabla 8	Principales características bioquímicas de <i>Enterobacter spp</i>	55
Tabla 9	Características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y otras <i>Pseudomonas</i> que producen Pigmento, encontradas en muestras clínicas	60
Anexo A	RECOMENDACIONES PARA LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS	69
Anexo B	METODO DE COLORACION DE GRAM	70
Anexo C	MEDIOS: PREPARACION Y RECOMENDACIONES	74
Anexo D	FICHA PARA ENVIO DE CEPAS	80

INTRODUCCION

Las infecciones intrahospitalarias cada vez más constituyen un serio problema de salud pública, ya sea por su efecto sobre la salud de los pacientes, como por los costos que este problema implica. Esto hace, que en el país se estén aunando esfuerzos para implementar sistemas de vigilancia, prevención y control, orientados a enfrentar este problema, lo cual a su vez repercutirá en la calidad de atención de los servicios hospitalarios.

Los pacientes con procesos infecciosos intrahospitalarios, pueden presentar una gran variedad de signos y síntomas, algunos de ellos pueden ser evidentes y fáciles de reconocer, mientras otros pueden pasar inadvertidos; por lo que el clínico debe basar su diagnóstico en otras evidencias disponibles, como son los aspectos epidemiológicos, y la importante contribución del laboratorio, que además de permitir el diagnóstico etiológico, orienta el manejo clínico terapéutico del paciente.

En este contexto, el Instituto Nacional de Salud en su rol de Centro de Referencia Nacional, establece procedimientos de laboratorio que se realizan en los diferentes establecimientos y niveles de la Red de Laboratorios, ha aprobado, previa validación con los expertos de microbiología de los principales hospitales nacionales del Ministerio de Salud - MINSa, el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS BACTERIOLOGICOS EN INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS.

Este manual tiene por objetivo establecer los procedimientos de diagnóstico bacteriológico y susceptibilidad antimicrobiana de los agentes más frecuentes de las infecciones intrahospitalarias, como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* siendo su propósito estandarizar los procedimientos bacteriológicos en los establecimientos de salud que desarrollan actividades vinculadas al manejo de las infecciones intrahospitalarias. La primera sección establece los objetivos, los campos de aplicación, responsabilidades y definiciones; en la segunda sección se orienta sobre la Bioseguridad; la tercera, está referida a los procedimientos de obtención de muestras; la cuarta sobre el envío y transporte de muestras, y la última sobre los procedimientos de diagnóstico bacteriológico.

El Instituto Nacional de Salud, organismo técnico normativo, pone a disposición del personal de salud este manual que representa el resultado del esfuerzo de los profesionales de la institución y otros destacados especialistas en el tema en nuestro país.

SECCION 1

GENERALIDADES

1.1 OBJETIVO

Establecer los procedimientos para realizar el diagnóstico microbiológico de infecciones intrahospitalarias causadas por *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* y *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2 CAMPO DE APLICACION

Comprende:

- Obtención de muestras de los pacientes.
- Envío de muestras al laboratorio.
- Procedimientos de laboratorio para el aislamiento e identificación de las bacterias involucradas en el proceso de la vigilancia en Infecciones Intrahospitalarias (IIH).
- Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.
- Control de calidad y registros necesarios para su control.

1.3 RESPONSABILIDADES

- 1.3.1 El Centro Nacional de Laboratorios en Salud Pública a través de su Dirección Ejecutiva de Laboratorios de Referencia, es responsable de autorizar la elaboración, revisión y actualización del presente Manual, de acuerdo a los procedimientos aprobados por el Instituto Nacional de Salud.
- 1.3.2 Los Directores de los establecimientos de salud, son responsables de autorizar, proporcionar los recursos necesarios y designar al personal responsable para la aplicación de las disposiciones contenidas en el presente Manual.
- 1.3.3 El personal de los establecimientos de salud, es responsable de planificar las acciones, organizar, controlar y capacitar al personal para cumplir las disposiciones contenidas en el presente Manual.
- 1.3.4 Los jefes o responsables de los laboratorios, deben asegurar el control interno de la calidad, la idoneidad del personal, equipos, materiales, reactivos e instalaciones.
- 1.3.5 El personal médico, técnico y operativo, es responsable de seguir las especificaciones contenidas en el presente Manual y aplicar los procedimientos específicos indicados.

1.4 DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- 1.4.2 Instituto Nacional de Salud - Manual de Procedimientos de Laboratorio para la obtención y envío de muestras (I). Serie de Normas Técnicas N° 15 –Segunda Edición –1997.
- 1.4.3 Instituto Nacional de Salud – Normas de Bioseguridad. Serie de Normas Técnicas N° 18 – Segunda Edición –1997.

1.5 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- 1.5.2 absceso:** Acumulación localizada de pus en un tejido u órgano.
- 1.5.3 aeróbico:** Un organismo que requiere oxígeno o aire atmosférico para su crecimiento y reproducción.
- 1.5.4 aglutinación:** Reacción por la que se provoca la agrupación de partículas, bacterias y células suspendidas en un medio líquido.
- 1.5.5 aislamiento primario:** Desarrollo inicial de microorganismos a partir de una muestra clínica.
- 1.5.6 antimicrobiano:** Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de microorganismos.
- 1.5.7 asepsia:** Desinfección de un tejido vivo o piel.
- 1.5.8 bacteria:** Microorganismo unicelular microscópico perteneciente a los procariotes que se multiplica por fisión binaria y carece de clorofila. Se diferencian por la coloración de Gram.
- 1.5.9 bacteria Gram negativa:** Aquella bacteria que no retiene el colorante primario (violeta de genciana o cristal violeta) en el método de Gram, son decoloradas por el alcohol y toman el color del colorante contraste (safranina ó fucsina) dando un color rojizo.
- 1.5.10 bacteria Gram positiva:** Aquellas bacterias que retienen el colorante primario del método de Gram, resisten la decoloración por el alcohol y no son coloreadas por el colorante de contraste reteniendo el color azul púrpura inicial.
- 1.5.11 bioseguridad:** Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánicos.
- 1.5.12 cepa bacteriana:** Cultivo puro de bacterias formada por los descendientes de un solo aislamiento.
- 1.5.13 colonia:** Crecimiento visible de microorganismos, generalmente en medios sólidos, originado por la multiplicación de un solo organismo. Todos son la progenie de una única bacteria preexistente.
- 1.5.14 Coloración Gram:** Método de tinción basado en la propiedad de retener o no el colorante cristal violeta en la pared celular bacteriana debido a su composición bioquímica después de ser sometido a un tratamiento de decoloración.
- 1.5.15 chorro medio de orina:** Muestra de orina obtenida después que el paciente deja discurrir cierta cantidad inicial.
- 1.5.16 desinfección:** Destrucción de las formas vegetativas de las bacterias en objetos inanimados. Se realiza con agentes químicos en estado líquido o con agua a temperaturas superiores a 75° C.
- 1.5.17 desinfectante:** Agente químico utilizado para el proceso de desinfección.
- 1.5.18 establecimiento de salud:** Hospital, clínica, centro de salud o lugar debidamente autorizado y equipado para la atención de pacientes.

- 1.5.19 esterilización:** Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.
- 1.5.20 fermentación:** Utilización de carbohidratos en forma anaerobia.
- 1.5.21 hemólisis:** Presencia de restos de eritrocitos lisados alrededor de una colonia desarrollada en una placa de agar sangre de carnero.
- 1.5.22 hemólisis alfa:** Las colonias están rodeadas por una destrucción parcial de los eritrocitos y pérdida de algo de hemoglobina en el agar lo que resulta en una coloración verde (hemólisis incompleta).
- 1.5.23 hemólisis beta:** Las colonias están rodeadas por una zona de hemólisis completa (clara, transparente) debido a una destrucción total de los eritrocitos.
- 1.5.24 incubación:** Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.
- 1.5.25 infección:** Invasión y multiplicación de microorganismos en un huésped, pudiendo progresar hacia una enfermedad. El término enfermedad infecciosa se aplica cuando aparecen signos y síntomas como resultado de la infección.
- 1.5.26 infección intrahospitalaria (IIH):** Infección que se adquiere luego de 48 horas de permanecer en el establecimiento de salud y que el paciente no portaba a su ingreso. Se consideran también a aquellos procesos infecciosos que ocurren hasta 30 días luego del alta.
- 1.5.27 inóculo:** Alicuota de una muestra que es transferida a un medio de cultivo.
- 1.5.28 limpieza:** Es la remoción mecánica de toda materia extraña con el objeto de disminuir el número de microorganismos. Se realiza a través del arrastre mecánico, sin embargo no se asegura la eliminación de éstos.
- 1.5.29 medio de cultivo:** Medio artificial de sustancias nutritivas necesarias para el crecimiento y multiplicación de las bacterias in vitro, que puede encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido.
- 1.5.30 metabolismo:** Proceso de degradación y biosíntesis enzimática que tiene lugar dentro de una célula y por medio del cual se mantienen las actividades nutricionales y funcionales.
- 1.5.31 microaerofílico:** Organismo que crece y se reproduce mejor en la presencia de una tensión del 5% de oxígeno, 10% de anhídrido carbónico y 85% de nitrógeno.
- 1.5.32 Microorganismo viable:** Es aquel que es capaz de reproducirse.
- 1.5.33 oxidación:** Reacción química que implica la pérdida de electrones de los átomos. Mezcla de una sustancia con el oxígeno y un aumento en la valencia.
- 1.5.34 reconstituir:** Restablecer la forma original de una sustancia previamente alterada para su conservación y almacenamiento, mediante la combinación con un líquido adecuado.

- 1.5.35 registro:** Documento que provee evidencias objetivas de las actividades efectuadas o de los resultados obtenidos.
- 1.5.36 sepsis:** Patología compleja de respuesta sistémica con compromiso multiorgánico, secundaria a la invasión del organismo por alguna bacteria u hongo.
- 1.5.37 siembra primaria:** Inoculación de una muestra a un medio de cultivo simple, selectivo o de enriquecimiento.
- 1.5.38 subcultivo:** Pasaje de bacterias viables derivadas de otro cultivo a un medio de cultivo nuevo.
- 1.5.39 UFC:** Unidad formadora de colonia.

1.6 CONDICIONES GENERALES PARA LA OBTENCION Y MANEJO DE MUESTRA

- 1.6.1** 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 flora normal.
- 1.6.2** 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.
- 1.6.3** Obtener la muestra antes del inicio de la terapia antimicrobiana. Si el paciente ya hubiera recibido alguna dosis del antimicrobiano al momento de obtener la muestra, el Laboratorio debe ser informado al respecto.
- 1.6.4** Enviar las muestras 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.
- 1.6.5** 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 derivan.
- 1.6.6** El paciente debe ser informado en forma clara y sencilla de acuerdo a su grado de instrucción sobre los procedimientos a realizar.

SECCION 2

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

- 2.1 El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico de infecciones intrahospitalarias debe aplicar las medidas de bioseguridad establecidas en las Normas de Bioseguridad. Serie Normas Técnicas N° 18.

- 2.2 Se deben controlar las medidas necesarias aplicables a:
 - 2.2.1 El personal.
 - 2.2.2 La vestimenta.
 - 2.2.3 Los ambientes.
 - 2.2.4 La obtención de muestras.
 - 2.2.5 El envío de muestras al laboratorio.
 - 2.2.6 Los casos de accidentes.
 - 2.2.7 El laboratorio.

SECCION 3

PROCEDIMIENTOS DE OBTENCION DE MUESTRA

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

3.1 OBTENCION DE MUESTRA DE SANGRE PARA CULTIVO

3.1.1 Condiciones específicas

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

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

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

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

3.1.2 Obtención de muestra de sangre mediante uso de jeringa:

3.1.2.1 Remitirse al Manual de Procedimientos de Laboratorio Para la Obtención y Envío de Muestras SERIE DE NORMAS TECNICAS N° 15, 2da ed. 1997.

Capítulo II. 2.2 Procedimiento de Obtención de Sangre Mediante Uso de Jeringa, pg. 17-19

3.1.2.2 La proporción entre el volumen de sangre obtenida y el volumen del caldo de cultivo debe estar en una relación de 1:5 - 1:10.

3.1.2.3 El volumen de sangre dependerá de la edad del paciente; por cada venopunción se recomienda:

Adultos:	10 - 30 ml
Niños:	1 - 5 ml
Lactantes:	1 - 2 ml
Neonatos:	0.5 - 1 ml

3.1.3 Inoculación de la muestra de sangre al medio de cultivo

- 3.1.3.1 Utilizar un medio bifásico o monofásico para este procedimiento. Desinfectar el diafragma del frasco de hemocultivo con alcohol de 70% o alcohol yodado.
- 3.1.3.2 Inocular la muestra de sangre al frasco con medio de cultivo a través del diafragma. Debe realizarse inmediatamente de obtenida la muestra para evitar que se coagule.
- 3.1.3.3 Mezclar el contenido del frasco inclinándolo suavemente dos o tres veces. En caso que se use el medio bifásico, bañar la fase sólida con la sangre.
- 3.1.3.4 Descartar la aguja y la jeringa en un contenedor resistente a las punturas. No volver a introducir la aguja en su funda.
- 3.1.3.5 Limpiar la tapa del frasco. Etiquetar el frasco apropiadamente indicando además el número de hemocultivo.
- 3.1.3.6 Transportar el hemocultivo inmediatamente al laboratorio de acuerdo a la norma 1.6.5.

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

3.1.4 Referencias:

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

3.2 OBTENCION DE MUESTRA DE DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES

3.2.1 Objetivo

Describir el procedimiento de obtención de muestra de dispositivos intravasculares.

3.2.2 Campo de Aplicación

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

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

3.2.3 Materiales

- a) Alcohol 70%
- b) Gasa estéril
- c) Tijera estéril
- d) Tubo o frasco con tapa rosca estéril
- e) Guantes de látex estériles
- f) Refrigeradora

3.2.4 Procedimiento

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

3.2.5 Referencias:

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

3.3 OBTENCION DE MUESTRA DE ORINA PARA CULTIVO

3.3.1 Objetivo

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

3.3.2 Campo de Aplicación

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

3.3.3 Condiciones Generales

La orina es un excelente medio de cultivo para la proliferación bacteriana, por esta razón, la muestra debe ser procesada dentro de las 2 horas después de haber sido obtenida o debe refrigerarse a 4° C (máximo 24 horas) hasta su procesamiento.

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

3.3.4 OBTENCIÓN DE MUESTRA DE ORINA DEL CHORRO MEDIO

3.3.4.1 Obtención de muestras de orina en pacientes mujeres hospitalizadas

Materiales y equipos

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

Procedimiento

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

3.3.4.2 Obtención de muestra de orina en pacientes varones

Materiales

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

Procedimiento

- a) Mantener la privacidad de la paciente.
- b) Rotular el frasco con el nombre de la paciente, fecha de obtención de la muestra, hora y el procedimiento a utilizar para la obtención de la muestra.
- c) Lavarse las manos con jabón y abundante agua.

- d) Preparar una pieza de gasa con agua y una pequeña cantidad de jabón. Preparar dos piezas más de gasa para el enjuague con agua tibia.
- e) Realizar la higiene de los genitales. Retraer el prepucio antes de lavar el glande con la gasa humedecida con jabón. Descartar la gasa.
- f) Enjuagar el glande, usando una gasa húmeda. Repetir el procedimiento con otra gasa.
- g) Secar la zona, usando uno o más piezas de gasa seca.
- h) Indicar al paciente que mantenga el prepucio retirado e inicie la micción directamente en un recipiente (orina para descartar).
- i) Después del chorro inicial colocar el frasco estéril para coleccionar la muestra del chorro medio.
- j) Obtenida la muestra, inmediatamente tapar el frasco y limpiar la superficie del mismo.
- k) Transportar el frasco con la muestra de orina inmediatamente al laboratorio de acuerdo a la norma 1.6.5.

3.3.5 OBTENCION DE MUESTRA DE URINA POR ASPIRACION DE CATETER VESICAL PERMANENTE

Material

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

Procedimiento

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

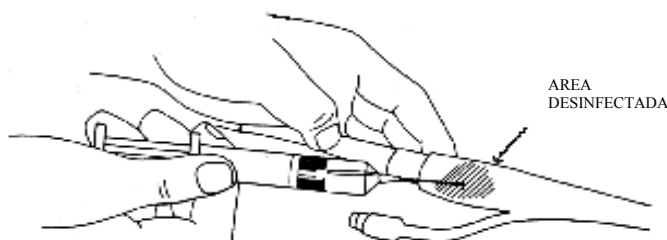


Figura 6. Método para obtener orina del catéter mediante punción.

3.3.6 OBTENCION DE MUESTRA DE ORINA POR ASPIRACION SUPRAPUBICA

3.3.6.1 Condiciones Generales

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

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

3.3.6.2 Procedimiento

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

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

3.3.6.3 Referencias:

- Miller J. Michael, Holmes H. Specimen collection, transport and storage. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 33 – 63.
- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. 3a ed Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana.. 1992.
- OPS. Vol IV *Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias*. Serie HSP/ Manuales Operativos Paltex. N°13, USA. 1996

3.4 OBTENCION DE MUESTRA DE HERIDA OPERATORIA

3.4.1 Objetivo

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

3.4.2 Obtención de muestra de herida operatoria con hisopo

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

Materiales

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

Procedimientos

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

3.4.3 Obtención de muestra de absceso por aspiración con aguja:

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

Materiales

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

Procedimiento

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

- c) Desinfectar la superficie con alcohol 70% o yodo - povidona.
- d) Introducir la aguja a través de la piel y/o la pared del absceso y aspirar aproximadamente 1 mL del material purulento con la jeringa.
- e) Colocar la muestra en un tubo estéril y enviar al laboratorio de acuerdo a los procedimientos indicados en la norma 1.6.5.
- f) Si el transporte de la muestra al laboratorio demora más de 20 - 30 minutos se debe mantener en medios de transporte como Stuart o Amies con carbón.
- g) En el medio de transporte, la muestra puede permanecer a temperatura ambiente hasta 24 horas.

NOTA:

En quemaduras:

- Limpiar y retirar el tejido muerto o quemado antes de la obtención de la muestra (puede ser un hisopado del exudado o una biopsia).
- Las muestras de tejido deben llevarse al laboratorio en gasa estéril o en un envase con tapa rosca.
- Los cultivos cuantitativos aún no están validados.

3.4.4 Referencias:

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

3.5 OBTENCION DE MUESTRAS DE SECRECIONES DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

3.5.1 Objetivo

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

3.5.2 Condiciones Específicas

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

3.5.3 Materiales

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

3.5.4 Procedimiento

- a) Colocar el aspirado transtraqueal o lavado broncoalveolar en un recipiente estéril (mínimo 1 mL de muestra) y el cepillo en un tubo con 1 mL de solución salina estéril o caldo tripticasa soya o infusión cerebro - corazón.
- b) Para el análisis cuantitativo de lavado broncoalveolar se debe transportar un volumen mínimo de 1 mL (en el proceso generalmente se obtiene de 40 mL a 80 mL de fluido).
- c) Para el análisis cuantitativo de la muestra obtenida por cepillo, ésta se debe colocar en 1 mL de caldo tripticasa soya o suero fisiológico y transportarla inmediatamente al laboratorio.
- d) De no ser así, éstas se pueden mantener en las condiciones arriba mencionadas, hasta por 2 horas a temperatura ambiente (15 a 30 minutos para volúmenes pequeños) ó 24 horas en refrigeración a 4° C.

3.5.5 Referencias

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

3.6 OBTENCION DE MUESTRA DE SECRECION ENDOMETRIAL PARA CULTIVO

3.6.1 Objetivo

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

3.6.2 Campo de aplicación

Se aplica en la obtención de muestras para el diagnóstico de laboratorio de bacterias aerobias en casos de endometritis. Este Manual no comprende los procedimientos para el aislamiento de bacterias anaeróbicas.

3.6.3 Condiciones Específicas

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

3.6.4 Materiales

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

3.6.5 Procedimiento

Muestra obtenida mediante hisopo

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

Muestra obtenida por aspiración

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

3.6.6 Referencia:

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

SECCION 4

ENVÍO Y TRANSPORTE DE MUESTRA

4.1 OBJETIVO

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

4.2 CONDICIONES ESPECIFICAS

La muestra debe ser mantenida lo más cerca posible de su estado original, debiendo evitarse temperaturas extremas o desecamientos excesivos.

Por lo general, volúmenes de 1 - 5 mL de muestra deben enviarse al laboratorio dentro de 15 a 30 minutos.

4.3 PROCEDIMIENTO

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

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

Tabla 1. Condiciones óptimas de la muestra para su Procesamiento, Transporte y Almacenamiento

TIPO DE INFECCION	TIPO DE MUESTRA	VOLUMEN MINIMO REQUERIDO	SISTEMA DE TRANSPORTE	TRANSPORTE (tiempo y temperatura)	ALMACENAMIENTO (tiempo y temperatura)
INFECCION DE HERIDA OPERATORIA	Secreción por hisopado	---	Stuart o Amies	≤ 30 min. Temperatura ambiente	≤ 24 h temperatura ambiente
	Secreción por aspiración de absceso	---	Tubo estéril o sistema de transporte de Stuart o Amies		
INFECCION DEL TORRENTE SANGUINEO	Sangre	Adultos: 10 – 30 mL Niños: 1 – 5 mL Lactantes: 1 – 2 mL Mantener una relación de 1:5 – 1:10 entre el volumen de sangre y el volumen del medio	Medio bifásico o monofásico	≤ 2 hr temperatura ambiente	≤ 24 h temperatura ambiente
INFECCION ASOCIADA A DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES	Dispositivos intravasculares	5 cm	Frasco estéril con tapa rosca	≤ 15 min. Temperatura ambiente	≤ 24 h 4°C
ENDOMETRITIS	Secreción	---	Stuart o Amies	≤ 2 hr temperatura ambiente	≤ 24 h temperatura ambiente
INFECCION DEL TRACTO URINARIO	Orina de Chorro medio	± 1 mL	Frasco estéril de boca ancha	≤ 2 h temperatura ambiente	≤ 24 h 4°C
	Orina por aspiración de catéter	± 1 mL	Tubo estéril		
	Orina por aspiración suprapubica	± 1 mL	Tubo estéril		
INFECCION DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR	Secreción obtenida por lavado bronco-alveolar, aspirado transtraqueal	≥ 1 mL	Frasco estéril con tapa rosca	≤ 2 h temperatura ambiente. En caso de volúmenes pequeños, 15 - 30 min.	≤ 24 h 4°C
	Cepillo bronquial	---	Tubo estéril con 1 mL de suero fisiológico o caldo BHI o TSB	15 - 30 min. Temperatura ambiente	

4.4 CRITERIOS PARA RECHAZAR UNA MUESTRA

- 4.4.1 Debe controlarse cada hoja de pedido y etiqueta de la muestra para ver si se ha incluido toda la información esencial.
- 4.4.2 Antes de rechazar una muestra debido a una información inapropiada o incompleta, debe establecerse contacto con la persona responsable para efectuar las correcciones necesarias para así poder completar la información.
- 4.4.3 Es necesario seguir estrictamente los procedimientos descritos, ya que la muestra obtenida puede ser rechazada por el personal de laboratorio de acuerdo a los siguientes criterios:
- a) No indicar tipo de muestra o procedencia
 - b) No indicar tipo de examen en la orden
 - c) Inadecuada temperatura de transporte
 - d) Demora en el envío al laboratorio
 - e) Medio de transporte inadecuado
 - f) Muestra sin rotular o mal rotulada
 - g) Muestra que tenga evidencias de haberse derramado
 - h) Recipiente inadecuado (con rajaduras por ejemplo)
 - i) Muestra con contaminación obvia
 - j) Muestra seca en el hisopo
 - k) Una sola muestra de hisopado con varias ordenes
 - l) Volumen inadecuado
- 4.4.4 En casos de muestras rechazadas el personal de laboratorio debe explicar al médico solicitante las razones y observaciones en la ficha de solicitud de diagnóstico correspondiente. En el caso de muestras que no puedan ser obtenidas nuevamente, la interpretación de la coloración Gram debe ser revisada cuidadosamente.
- 4.4.5 Es importante el examen microscópico del material clínico, ya que permite conocer no sólo la calidad de la muestra, sino también la presencia de microorganismos, lo que proporciona suficiente información para un diagnóstico presuntivo inmediato.

4.5 Referencias:

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

SECCION 5

PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

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

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

5.1 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE ORINA

5.1.1 Objetivo

Describir el procedimiento para la siembra primaria de muestra de orina

5.1.2 Campo de aplicación

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

5.1.3 Materiales y equipos

- a) Asa calibrada de platino o descartable de 0.001mL, 0.01 mL
- b) Estufa de 35 – 37° C
- c) Mechero Bunsen o Cabina de Flujo laminar
- d) Guantes de látex
- e) Contenedor de material contaminado
- f) Pinza estéril
- g) Propipeta o pipetor automático
- h) Medios de cultivo
 - Placas con agar sangre de carnero (AS)
 - Placas con agar Mc Conkey (McC)

5.1.4 Procedimiento

- a) Mantener las muestras en refrigeración (4° C) hasta su procesamiento por cultivo.
- b) Los cultivos deben realizarse en una cabina de bioseguridad o cerca del mechero Bunsen.
- c) Las placas con AS y McC que se utilizarán en el urocultivo deben estar a temperatura ambiente. Rotular las placas.
- d) Si el asa calibrada no es descartable, esterilizar el asa de siembra flameándola en el mechero Bunsen hasta que se ponga rojo vivo. Dejar enfriar el asa contando hasta 20.
- e) Tomar el frasco con la muestra de orina, abrir la tapa y flamear la boca del frasco en el mechero Bunsen.
- f) Tomar la muestra de orina con el asa de siembra estéril introduciéndola y sacándola del frasco en forma vertical (Véase Figura 7a). Tapar el frasco con la muestra.
- g) Inocular en el centro de la placa con AS a partir del cual se extiende la muestra, hacia delante y hacia atrás (Véase Figura 7b).

- h) Luego, sin quemar el asa, el inoculo se disemina uniformemente con trazos perpendiculares a la siembra inicial en toda la placa (Véase Figura 7c).
- i) Proceder de la misma forma para el agar Mc Conkey.
- j) Esterilizar el asa de siembra en el mechero.
- k) Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba. Incubar la placa de AS y Mc Conkey a 35 - 37° C en condiciones aeróbicas por 24 horas.

Tabla 2:

Asas de siembra recomendadas para cada método de muestras de orina

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

(*) Una colonia = 1000 UFC/ mL



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



Figura 7c. Sin flamear el asa estriar atravesando la línea del inoculo en el sentido de las flechas.

Figura 7: Método para sembrar con asa calibrada

5.1.5 Lectura

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

5.1.6 Interpretación

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

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

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

5.1.7 Referencias

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

5.2 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HEMOCULTIVO

5.2.1 Objetivo

Describir la técnica de siembra primaria de hemocultivo para el aislamiento de bacterias causantes de infecciones del torrente sanguíneo.

5.2.2 Campo de aplicación

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

5.2.3 Materiales y equipos

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

5.2.4 Procedimiento

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

5.2.5 Subcultivo

- a) Los subcultivos deben realizarse en cabina o cerca de un mechero de Bunsen.
- b) Realizar subcultivos ciegos dentro de las 12 y 24 horas de incubación.
- c) Para realizar los subcultivos desinfectar la superficie de la tapa del frasco con alcohol de 70%.
- d) Con una jeringa estéril, extraer a través del tapón de jebes la muestra de sangre.
- e) Inocular una gota de la muestra del hemocultivo en un extremo de la superficie de las placas de agar sangre, agar Mac conkey y colocar cuidadosamente una gota sobre una lámina portaobjetos para hacer un frotis y coloración Gram.

- f) Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en los cuatro cuadrantes de la placa, con el propósito de obtener colonias aisladas (Véase Figura 8).
- g) Incubar las placas de AS y agar McC a 35 - 37° C por 24 horas.
- h) Observar la lámina coloreada y buscar la presencia de bacterias.
- i) Si no hay crecimiento a las 24 horas seguir incubando hasta por 48 horas.
- j) Si no hubiera desarrollo bacteriano, repetir el procedimiento al 5° y 7° día.

NOTA: Se recomienda usar una jeringa de tuberculina.

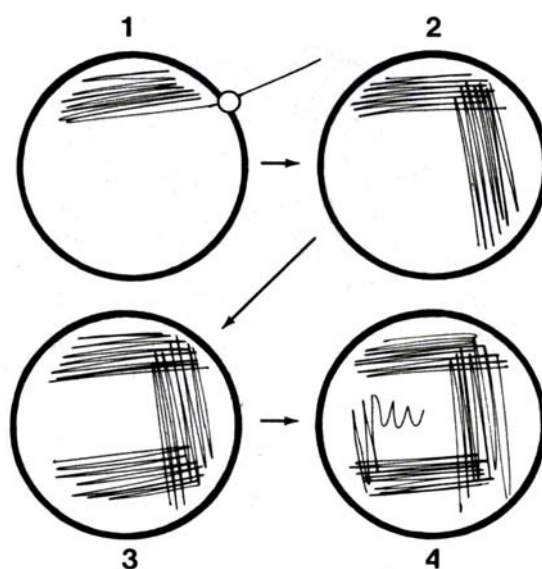


Figura 8: Siembra por dispersión agotamiento

5.2.6 Lectura de subcultivos

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

5.2.7 Referencias

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana. 3a ed. 1992, Buenos Aires.
- OPS. Vol IV *Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias*. Serie HSP/ Manuales Operativos Paltex. N°13, USA. 1996.
- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 64 – 104.

5.3 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE PUNTA DE DISPOSITIVO INTRAVASCULAR

5.3.1 Objetivo

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

5.3.2 Campo de Aplicación

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

5.3.3 Materiales y Equipos

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

Medio de Cultivo:

- Agar sangre de carnero (AS)

5.3.4 Procedimiento

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

5.3.5 Lectura

Realizar el recuento de colonias.

Positivo : Recuentos mayores de 15 UFC.

Negativo: Recuentos menores o iguales a 15 UFC.

5.3.6 Referencias

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

5.4 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HERIDA OPERATORIA

5.4.1 Objetivo

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

5.4.2 Campo de aplicación

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

5.4.3 Materiales y Equipos

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

5.4.4 Procedimiento

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

- f) Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa, con el propósito de obtener colonias aisladas (Véase Figura 8).
- g) Incubar las placas de AS a 35° C por 24 horas y el agar McC en condiciones aeróbicas y por 24 horas.
- h) Esterilizar el asa de siembra en el mechero.
- i) Concluida la siembra, cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- j) Incubar las placas a 35 – 37° C por 24 - 48 horas en condiciones aeróbicas.

5.4.5 Lectura

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

5.4.6 Referencia

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

5.5 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

5.5.1 Objetivo

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

5.5.2 Campo de aplicación

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

5.5.3 Condiciones generales

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

5.5.4 Cultivo de Aspirado transtraqueal:

5.5.4.1 Materiales y Equipos

- a) Estufa de 35 – 37° C
- b) Mechero Bunsen o Cabina de Flujo laminar
- c) Guantes de látex
- d) Mascarilla
- e) Contenedor de material contaminado

Medios de cultivo:

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

5.5.4.2 Procedimiento

Cultivo:

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

Frotis:

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

Lectura a las 24 horas

Si no hubiera crecimiento incubar por 24 horas más.

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

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

5.5.5.1 Muestra de Cepillado Bronquial

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

Materiales y Equipos

- a) Asa calibrada de platino o descartable de 0.01 mL o tip estéril (10 - 100ul) y micropipeta
- b) Estufa de 35 – 37° C
- c) Mechero Bunsen o Cabina de flujo laminar
- d) Guantes de látex
- e) Mascarilla

- f) Contenedor de material contaminado

Medios de cultivo:

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

Procedimiento

Cultivo:

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

Lectura a las 24 horas

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

Interpretación

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

Frotis:

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

5.5.5.2 Muestra de Lavado Broncoalveolar

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

Materiales y Equipos

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

Medios de cultivo:

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

Procedimiento

Cultivo:

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

Lectura a las 24 horas

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

Interpretación

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

Frotis:

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

Interpretación

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

5.5.6 Referencias

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

5.6 SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA EN CASOS DE ENDOMETRITIS

5.6.1 Objetivo

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

5.6.2 Campo de Aplicación

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

5.6.3 Materiales y equipos

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

Medios de Cultivo

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

5.6.4 Procedimiento

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

5.6.5 Lectura

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

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

SECCION 6

IDENTIFICACION BACTERIANA

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

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

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

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

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

6.1.1 Objetivo

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

6.1.2 Campo de aplicación

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

6.1.3 Condiciones generales

- a) La primera consideración práctica a tomar en cuenta es determinar, si un aislamiento es estafilococo, estreptococo o enterococo. Esta diferenciación se realiza en base a la morfología de la colonia, tipo de hemólisis, forma de las bacterias por coloración Gram a partir de un cultivo y de la prueba de reacción de la catalasa.
- b) Las colonias de estafilococos son comúnmente grandes (2 mm a 3 mm a las 24 horas), convexas, lisas, enteras, opacas y con frecuencia pigmentadas, a diferencia de las colonias

de estreptococos y enterococos que son más pequeñas (menos de 2 mm de diámetro), puntiformes, con aspecto translúcido a semiopaco.

- c) Los estafilococos pueden ser fuertemente β hemolíticos 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.

6.1.4 Identificación de estafilococos

6.1.4.1 Lectura de Cultivos en Agar sangre de carnero y Agar Columbia CNA-sangre

a) Morfología de las colonias

Las colonias de la mayoría de *Staphylococcus* son lisas, enteras, algo elevadas. Miden aproximadamente de 1 a 3 mm de diámetro a las 24 horas. Si las placas se siguen incubando tres días a 34 – 37° C las colonias pueden medir de 3 - 8 mm dependiendo de las especies.

Las colonias de *Staphylococcus aureus* normalmente son grandes, éstas siguen desarrollando si se deja en incubación por unos días más. Son de borde entero, de superficie lisa, la mayoría de ellas presentan un pigmento que va desde el amarillo crema hasta el naranja.

Las colonias de *Staphylococcus epidermidis* son algo más pequeñas dependiendo de las cepas, usualmente no se detecta pigmentos. Las colonias de *Staphylococcus saprophyticus* son más grandes que *S. epidermidis*, son lustrosas y más convexas que otras colonias de estafilococos. Un 50% de las cepas son pigmentadas (Foto N° 1).

b) Coloración Gram

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

c) Prueba de la catalasa ⁽¹⁾

Determina la presencia de la enzima catalasa, esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Foto N° 2).

Reactivo

Peróxido de hidrógeno 3%

Procedimiento

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18 a 24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio.
- Agregar una gota de H₂O₂ al 3% usando un gotero o una pipeta pasteur.

- No es necesario mezclar el cultivo con el H₂O₂.
- Observar una inmediata efervescencia (formación de burbujas) lo que indica una prueba positiva, de lo contrario se considera la prueba negativa.
- Desechar el portaobjetos colocándolo en un desinfectante
- Realizar este procedimiento en forma paralela con cepas controles:
 - Control positivo : *S. aureus*.
 - Control negativo: *Streptococcus spp*

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

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

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

d) Prueba de la coagulasa

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

Reactivo

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

NOTA: El plasma humano no debe ser usado a menos que haya sido cuidadosamente probado de no contener algún agente infeccioso, capacidad de coagulación e inhibidores.

Controles:

Positivo : *S. aureus*

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

Prueba en Lámina

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

Procedimiento

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

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

Prueba en Tubo

Procedimiento

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

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

e) Resistencia a la novobiocina

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

Medios y Reactivos

- TSA con sangre de carnero o Agar Mueller Hinton
- Suero fisiológico o Caldo tripticasa soya
- Discos de novobiocina (5 µg por disco)

- Escala 0.5 de Mc Farland
- Incubadora a 35 – 37° C
- Vernier o regla

Procedimiento

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

Lectura

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

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

f) Resistencia a la polimixina B

Medios y Reactivos

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

Procedimiento

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

Lectura

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

6.1.4.2 Resultados:

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

Nota: Las identificaciones de los estafilococos coagulasa negativos son presuntivas y deben ser confirmadas en el Laboratorio Referencial.

Tabla 3. Principales características fenotípicas de las especies de Staphylococcus comúnmente aislados en infecciones

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

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

Fuente: Kloos W, Bannerman T. Staphylococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 264 – 282.

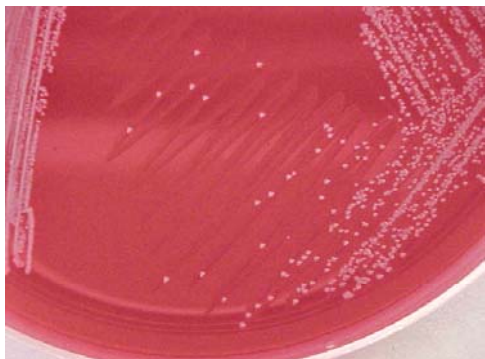


Foto N° 1



Foto N°2



Foto N°3

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

Foto N°2: Prueba de catalasa

Foto N°3: Prueba de coagulasa en tubo

6.1.5 Identificación de enterococos:

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

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

a) Apariencia de las colonias

Usualmente son alfa hemolíticas o no hemolíticas en agar sangre de carnero 5% aunque también puede haber especies beta hemolíticas como algunas cepas de *E. durans*. (Foto N° 4)

b) Coloración Gram

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

Tabla 4. Principales características fenotípicas de cocos gram positivos en cadena, catalasa negativos

	Bilis esculina	CINa 6.5%	Crecimiento		Hemólisis
			10°C	45°C	
<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	α , β , n
<i>Streptococcus</i>	- ^a	- ^b	-	V	α , β , n
<i>Lactococcus</i>	+	V	+	V	α , n
<i>Vagococcus</i>	+	+	+	V	α , n

a De los estreptococos viridans 5% – 10% son bilis esculina positivas

b Algunos estreptococos β hemolíticos crecen en 6,5% CINa.

n No hemolítico

+ $\geq 95\%$ reacciones positivas

- $\leq 5\%$ reacciones positivas

V reacciones variables

Fuente: Facklam R, Sahn D, Martins L. Enterococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 297 – 305.

c) Prueba de la catalasa

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

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

d) Prueba de la esculina en medio con bilis

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

Procedimiento

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

Lectura:

Positivo: En tubo: Ennegrecimiento difuso en el agar inclinado

En placa: Se observa un halo negro o marrón alrededor de las colonias en la placa.

Negativo: No se produce ennegrecimiento del medio o ennegrecimiento de menos de la mitad del tubo después de 72 horas de incubación.

Controles

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

e) Tolerancia al cloruro de sodio

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

Procedimiento

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

Lectura:

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

Controles

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

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

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

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

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

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

a) Crecimiento en telurito de potasio

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

Procedimiento:

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

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

a) Metabolismo de carbohidratos

Procedimiento

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

Lectura

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

b) Descarboxilación de la arginina

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

Tabla 5. Principales características fenotípicas usadas para la identificación de *Enterococcus* de mayor importancia clínica y géneros relacionados

	TELURITO	MANITOL	SORBOSA	ARGININA	ARABINOSA	RAFINOSA	SORBITOL
<i>E. avium</i>	-	+	+	-	+	-	+
<i>E. raffinosus</i>	-	+	+	-	+	+	+
<i>E. saccharolyticus</i>	-	+	+	-	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	+	+*	-	+*	-	-	+
<i>E. faecium</i>	-	+*	-	+	+	V	V
<i>E. durans</i>	-	-	-	+	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	-	+	-	V	-
<i>E. gallinarum</i>	-	+*	-	+*	+	+	-
<i>E. mundtii</i>	-	+	-	+	+	+	V
<i>Lactococcus</i>	-	+	-	+	-	-	+

+ ≥ 90% reacciones positivas

- ≤ 10 % reacciones positivas

V reacciones variables

* Excepciones ocasionales (< 3 % de cepas muestran reacciones aberrantes)

Fuente: Facklam R, Sahm D, Martins L. *Enterococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 297 – 305.



Foto N° 4

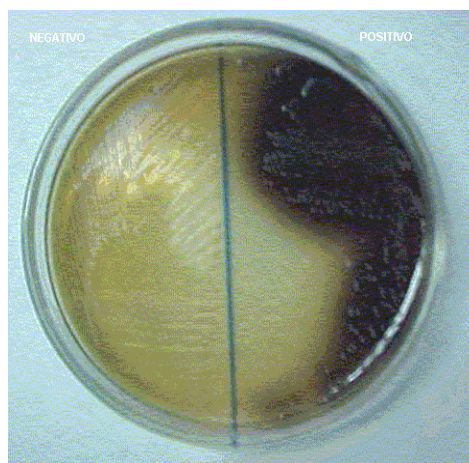


Foto N° 5

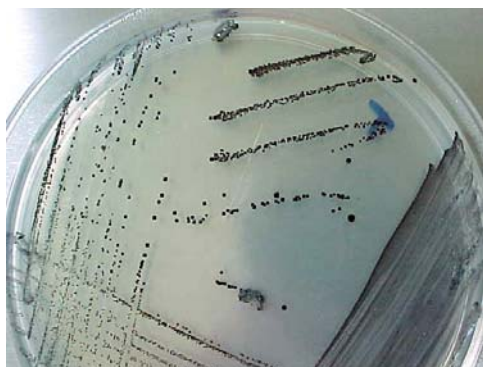


Foto N° 6



Foto N° 7

- Foto N°4:** Colonias de *Enterococcus faecalis* en agar sangre
Foto N°5: Hidrólisis de la esculina en medio bilis esculina
Foto N°6: Desarrollo de *E. faecalis* en agar telurito de potasio 0.04%
Foto N°7: Descarboxilación de la arginina en medio de Moeller

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

6.2.1 Objetivo

Describir los procedimientos de cultivos e identificación de bacilos Gram negativos fermentadores: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter*.

6.2.2 Campo de aplicación

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

6.2.3 Condiciones generales

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

6.2.4 Lectura de cultivos en Agar Mac Conkey

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

Las colonias con estas características son subcultivadas en medios diferenciales.

6.2.5 Pruebas bioquímicas

- a) Utilización de lactosa
- b) Utilización de glucosa
- c) Producción de gas de glucosa
- d) Descarboxilación de lisina
- e) Producción de ácido sulfhídrico
- f) Utilización del citrato
- g) Producción de ureasa
- h) Prueba MR
- i) Prueba VP
- j) Motilidad
- k) Producción de indol
- l) Prueba de ONPG

6.2.5.1 Procedimiento

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

6.2.5.2 Lecturas

a) Agar TSI

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

Lectura

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

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

NOTA: Cuando el microorganismo también produce H₂ S el precipitado negro puede ocultar la acidez.

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

Resultados

Ejemplo de simbolización e interpretación:

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

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

Controles

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

Recomendaciones

Si se observa que no hay cambio de color en el tubo hasta las 24 horas seguir incubando hasta las 48 horas. Si no se observa viraje de color y hay desarrollo, se trata de una bacteria no fermentadora (Foto N° 11).

b) Agar Lisina Hierro

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

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.

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

Recomendaciones

No incubar más del tiempo necesario para no ocasionar una alcalinización en la superficie del medio y por lo tanto producir un viraje hacia el violeta.

Controles

	Columna vertical (fondo)	Superficie inclinada (pico de flauta)
<i>E. coli</i>	amarillo	violeta
<i>Proteus mirabilis</i>	amarillo y negro	rojo-parduzco
<i>Morganella morganii</i> (Foto N° 12)	amarillo	rojo parduzco-violeta.

c) Utilización de citrato

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

Procedimiento

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

Resultados

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

Controles

Positivo: *Enterobacter cloacae*

Negativo: *Escherichia coli*

(Foto N° 13)

d) Hidrólisis de la urea (producción de ureasa)

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

Procedimiento

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

Resultados

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

Prueba negativa: No se produce cambio de color.

Controles

Negativo: *Escherichia coli*

Positivo: *Klebsiella pneumoniae*

(Foto N° 14)

e) Rojo de metilo

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

Procedimiento

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

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

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

Resultados

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

Controles

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

f) Voges Proskauer

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

Medios y reactivos

Medio MR VP
 α naftol al 5 %
KOH al 40%.

Procedimiento

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

Resultados

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

Controles

Control positivo: *Klebsiella pneumoniae*

Control negativo: *Escherichia coli*

(Foto N° 16)

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

Para determinar si un organismo es móvil o inmóvil.

Procedimiento

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

Resultados

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

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

Controles

Control positivo: *Escherichia coli*

Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*

(Foto N° 17)

h) Prueba de indol

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

Medios y Reactivos

Caldo de triptófano o de peptona o caldo de triptona.

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 repetirse la prueba.

Resultados

Prueba positiva: Formación de un anillo rojo en la superficie del medio (la capa alcohólica)

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

Controles

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

i) Prueba de la β galactosidasa (ONPG)

Es útil para demostrar la presencia o ausencia de la enzima β -galactosidasa utilizando el compuesto orgánico o - nitrofenil - β -D galactopiranosido (ONPG) y para diferenciar los organismos con reacción retardada a la lactosa de los organismos lactosa negativos.

Reactivo

Discos o tabletas de ONPG.

Procedimiento

Seguir las instrucciones del fabricante.

Resultados

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

Prueba negativa: No hay cambio de color.

Controles

Control positivo: *Escherichia coli*
Control negativo: *Proteus spp*

NOTA 1:

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

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

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

(*) Si no se dispone del medio MIO.

j) Producción de descarboxilasas

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

Procedimiento

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

Lectura

Positivo: Color azul púrpura en el tubo que contiene el aminoácido

Negativo: Color amarillo

- Anotar los resultados de las pruebas de utilización de carbohidratos y producción de descarboxilasas.
- Realizar la identificación de acuerdo a las Tablas N° 4, 5, 6.

Tabla 6. Principales características bioquímicas de *Escherichia spp*

Prueba	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> inactiva	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>
Indol	98	80	98	99	0
Rojo de metilo	99	95	100	100	100
Voges Proskauer	0	0	0	0	0
Citrato (Simmons)	1	1	17	1	0
Hidrogeno sulfurado (TSI)	1	1	0	0	0
Hidrólisis de urea	1	1	0	0	0
Lisina descarboxilasa	90	40	95	6	85
Arginina descarboxilasa	17	3	5	0	30
Ornitina descarboxilasa	65	20	100	100	0
Motilidad	95	5	93	99	100
Hidrólisis gelatina (22°C)	0	0	0	0	0
Acidez D-glucosa	100	100	100	100	100
Gas D-glucosa	95	5	95	97	97
Lactosa (fermentación)	95	25	0	45	15
ONPG	95	45	83	98	100

Cada número representa el porcentaje de reacciones positivas después de dos días de incubación a 36°C. La mayoría de estas reacciones positivas suceden dentro de las 24 horas. Las reacciones que se vuelven positivas después de los dos días no se consideran.

Fuente: Farmer III J. *Enterobacteriaceae: Introduction and identification*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 447- 458

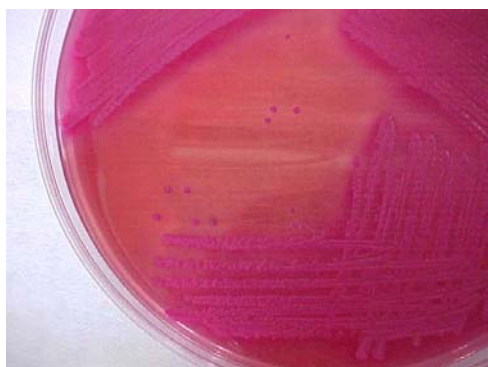


Foto N°8



Foto N°9



Foto N°10



Foto N°11

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



Foto N°12



Foto N°13

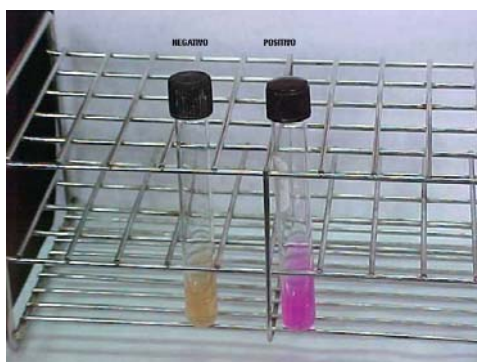


Foto N°14

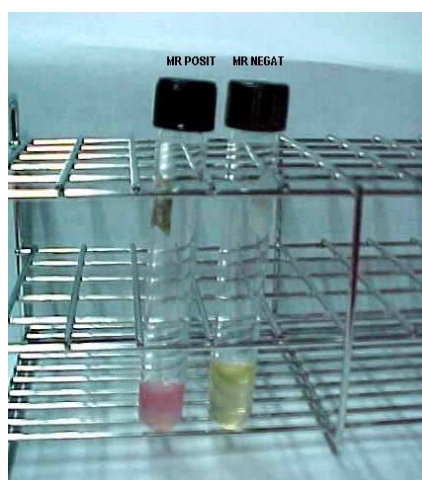


Foto N°15

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

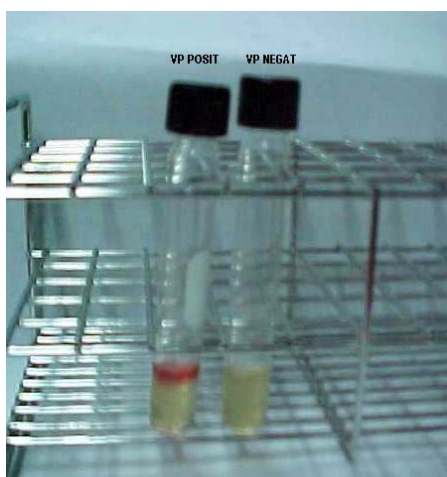


Foto N°16



Foto N°17

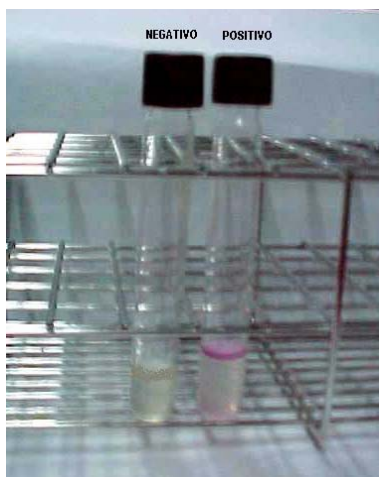


Foto N°18

Foto N°16: Prueba de Voges proskauer.

Foto N°17: Prueba de movilidad.

Foto N°18: Prueba de indol.

Tabla 7. Principales características bioquímicas de *Klebsiella*

Prueba	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. ornithinolytica</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ozaeneae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>
Indol	0	99	100	20	0	0
Rojo de metilo	10	20	96	100	98	100
Voges Proskauer	98	95	70	98	0	0
Citrato (Simmons)	98	95	100	100	30	0
Hidrogeno sulfurado (TSI)	0	0	0	0	0	0
Hidrólisis de urea	95	90	100	98	10	0
Lisina descarboxilasa	98	99	100	100	40	0
Arginina descarboxilasa	0	0	0	0	0	0
Ornitina descarboxilasa	0	0	100	0	3	0
Motilidad	0	0	0	0	0	0
Hidrólisis gelatina (22°C)	0	0	0	0	0	0
Acidez D-glucosa	100	100	100	100	100	100
Gas D-glucosa	97	97	100	100	50	0
Lactosa (fermentación)	98	100	100	100	30	0
ONPG	99	100	100	100	80	0

Cada número es el porcentaje de reacciones positivas después de dos días de incubación a 36° C. La mayoría de estas reacciones positivas suceden dentro de las 24 horas. Las reacciones que se vuelven positivas después de los dos días no se consideran.

Fuente: Farmer III J. *Enterobacteriaceae: Introduction and identification*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 447- 458.

Tabla 8. Principales características bioquímicas de *Enterobacter spp*

PRUEBA	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. grupo agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. taylora</i>	<i>E. amnigenus biogrupo 1</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. amnigenus biogrupo 2</i>	<i>E. hormaechi</i>	<i>E. intermedium</i>
Indol	0	0	20	0	11	0	0	0	0	0	0
Rojo de metilo	5	5	50	5	5	5	7	100	65	57	100
Voges Proskauer	98	100	70	100	100	100	100	2	100	100	100
Citrato (Simmons)	95	100	50	99	99	100	70	100	100	96	65
Hidrogeno sulfurado (TSI)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hidrólisis de urea	2	65	20	93	1	1	0	60	0	87	0
Lisina descarboxilasa	98	0	0	90	0	0	0	0	0	0	0
Arginina descarboxilasa	0	97	0	0	99	94	9	21	35	78	0
Ornitina descarboxilasa	98	96	0	100	91	99	55	95	100	91	89
Motilidad	97	95	85	90	96	99	92	0	100	52	89
Hidrólisis gelatina (22°C)	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Acidez D-glucosa	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Gas D-Glucosa	100	100	20	98	98	100	100	95	100	83	100
Lactosa (fermentación)	95	93	40	55	99	10	70	75	35	9	100
ONPG	100	99	90	97	100	100	91	100	100	95	100

Cada número es el porcentaje de reacciones positivas después de dos días de incubación a 36°C. La mayoría de estas reacciones positivas suceden dentro de las 24 h, las reacciones que se vuelven positivas después de los dos días no son consideradas.

Fuente: Farmer III J. *Enterobacteriaceae: Introduction and identification*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 447- 458.

6.3 IDENTIFICACIÓN DE BACILO GRAM NEGATIVO NO FERMENTADOR: *Pseudomonas aeruginosa*

6.3.1 Objetivo

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

6.3.2 Condiciones generales

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

Morfología de la colonia
Producción de pigmentos difusibles si están presentes
Olor característico.

6.3.3 Identificación

6.3.3.1 Morfología de las colonias

Las colonias generalmente son planas, algo extendidas, bordes aserrados y tienen un brillo metálico (Foto N° 19).

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

6.3.3.2 Determinación de las características bioquímicas

Identificada la colonia sospechosa. Realizar las siguientes pruebas:

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

6.3.4.3 Procedimiento

- a) Identificar la colonia sospechosa que se encuentra en la placa de agar Mc Conkey.
- b) Esterilizar al rojo vivo el asa de siembra recta en un mechero de Bunsen.
- c) Enfriar el asa.
- d) Obtener la colonia seleccionada con el asa recta, tratando de no tocar el fondo del medio de cultivo ni otra colonia vecina.
- e) Sembrar por estría en los medios diferenciales empezando por el agar citrato (en la superficie), TSI, LIA (introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, retirar por el mismo trazo y sembrar en estría la parte inclinada), caldo para la prueba de indol y caldo nitrato.
- f) Sembrar por puntura en el centro del agar gelatina (hasta una profundidad de 1,5 cm - 2,5 cm) y agar movilidad hasta una profundidad aproximada de 1.5 cm.

- g) Quemar el asa y dejar enfriar.
- h) Con el asa recta obtener la misma colonia trabajada y cogerla tratando de no tocar el fondo del medio de cultivo ni otra colonia vecina y sembrar haciendo pequeños trazos en el extremo de dos placas de TSA o Mueller Hinton (sembrar solo una placa de TSA o Mueller Hinton si no se dispone de incubadora a 42° C).
- i) Utilizando un asa de siembra en aro estéril y tomando como referencia central el inóculo de la colonia, realizar la siembra por dispersión agotamiento en los cuadrantes de la placa.
- j) Incubar a 35 – 37° C de 18 a 24 horas a excepción de una placa de TSA que debe ser incubada a 42° C.

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

6.3.4.4 Lecturas

a) Agar TSI

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

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

b) Prueba de utilización de citrato

Procedimiento

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

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

c) Prueba de hidrólisis de la gelatina

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

Medio

Gelatina nutritiva pH 6,8

Procedimiento

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

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

Incubar los cultivos en estudio y de control a 22 - 25° C por 24 - 48 horas y hacer la lectura. Evaluar diariamente el cultivo durante 14 días.

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

Controles

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

Resultados

Positivo : medio de cultivo semilíquido.
Negativo: medio de cultivo sólido.

Recomendaciones

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

d) Prueba de reducción de nitrato a nitritos

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

Medios y reactivos

Caldo con nitrato: pH 7
Reactivo A (Ver anexo C)
Reactivo B (Ver anexo C)
Polvo de zinc

Procedimiento

Incubar a 35 – 37° C por 12 a 24 horas. Puede requerir una incubación hasta 5 días pero no es frecuente.
Agregar directamente al caldo de cultivo, 1 gota del reactivo A y 1 gota del reactivo B.

Resultados

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

Controles

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

Control positivo : *Escherichia coli*

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

e) Prueba de la oxidasa

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

Reactivos

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

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

Procedimiento

Se trabaja a partir del crecimiento bacteriano en TSA o Mueller Hinton.

Humedecer un trozo de papel de filtro con el reactivo dentro de una placa petri.

Con la ayuda de un mondadiente o un asa de platino o aluminio (el nícrón u otro material de las asas que contienen fierro pueden causar reacciones falsas positivas) se coge la colonia a probar y se coloca extendiéndola sobre el papel filtro.

Controles

Positivo : *P. aeruginosa*

Negativo: *E. coli*

Resultados

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

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

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

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

f) Crecimiento a 42° C

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

Resultados

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

g) Producción de pigmentos

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

P. aeruginosa produce pigmentos: verdoso o azul verdoso brillante, rojo o marrón.

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

Lectura:

Si no se observara pigmento dejar la placa incubando a temperatura ambiente y realizar la lectura a las 48 horas (Foto N° 24).

6.3.4.5 Resultados

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

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

Tabla 9. Características de *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas* que producen pigmento, encontradas en muestras clínicas

Prueba	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
Oxidasa	99	97	100
Crecimiento en:			
Agar Mc Conkey	100	100	100
42°C	100	0	0
Reducción de nitrato	98	19	0
Pioverdina	65	96	93
Indol	0	0	0
Hidrólisis de la Gelatina	82	100	0
Citrato de Simmons	95	93	94(6)

Porcentaje de cepas positivas

Porcentajes en paréntesis representan cepas con reacciones retrasadas

Fuente: Kiska D, Gilligan P. *Pseudomonas*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 517 – 525.

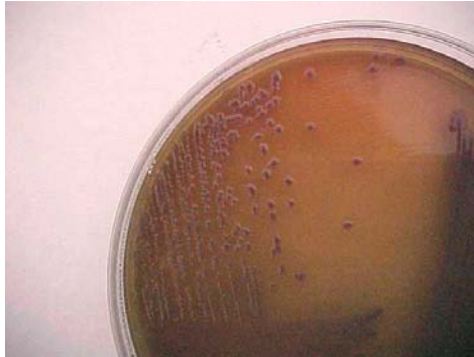


Foto N° 19

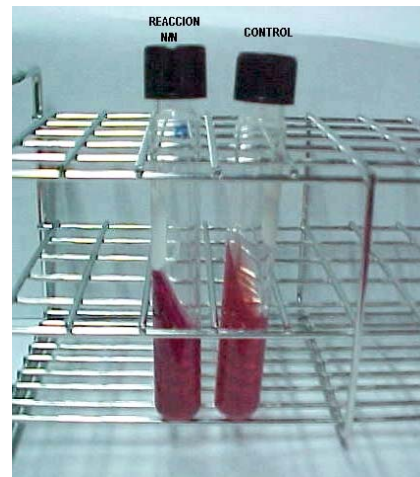


Foto N° 20



Foto N° 21

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

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

Foto N°21: Hidrolisis de la gelatina



Foto N° 22



Foto N° 23



Foto N° 24

Foto N°22: Prueba de reducción del Nitrato.

Foto N°23: Prueba de la oxidasa.

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

Referencias:

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

SECCION 7

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE DISCO DIFUSION

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

Para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos de las diferentes especies y cepas de un microorganismo se aplica el método de disco difusión el mismo que se describe en el documento M2-A7.17 (1) 2000 NCCLS Performance standard for antimicrobial disk Susceptibility Test: Approved Standard 7° Ed., complementada con las Tablas descritas en el documento M100-S11 (M2) 2001 NCCLS Disk Diffuson Supplemental Tables.

Nota: Solicitar al proveedor de los discos de susceptibilidad un certificado de calidad expedido por el Centro de Control de Calidad del INS.

SECCION 8

CONTROL DE CALIDAD

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

8.1 Control interno de la calidad

- 8.1.1 Los colorantes y reactivos usados para la identificación bacteriana deben probarse inmediatamente después de la preparación y periódicamente para evaluar las características de tinción esperadas y la correcta reactividad de los medios apropiados con cepas referenciales o de reactividad conocida.
- 8.1.2 Debe llevarse un registro del control de calidad de los medios de cultivo, colorantes y reactivos en el que se incluya: fecha, número de control o lote, control positivo y negativo utilizado, resultados de la prueba y nombre de la persona que realizó la prueba. Los registros deben estar a disposición de todo el personal del laboratorio.
- 8.1.3 Es necesario llevar registros de temperatura y de mantenimiento de los equipos para documentar el correcto funcionamiento de los mismos y demostrar que los hallazgos de laboratorio constituyeron realmente determinaciones válidas.
- 8.1.4 Para asegurar la confiabilidad del diagnóstico microbiológico de las infecciones intrahospitalarias se realiza la verificación del cumplimiento de las especificaciones contenidas en el presente Manual de Procedimientos.
- 8.1.5 Se verifica el cumplimiento de la frecuencia programada para controlar el estado de calibración de los equipos y los medios de medición.

- 8.1.6** En caso de identificarse disconformidades en la aplicación de las especificaciones, se informa al personal responsable del laboratorio, quien decide la adopción de medidas correctivas necesarias y la identificación de las causas.

SECCION 9

REGISTROS

- 9.1** La aplicación de las disposiciones contenidas en el presente Manual exige la generación, uso y conservación de registros necesarios para demostrar el cumplimiento de las especificaciones y requisitos que aseguran la confiabilidad y garantía de los diagnósticos de las infecciones intrahospitalarias.
- 9.2** El personal directivo del establecimiento de salud determina el periodo de conservación de los diferentes registros. Este periodo es definido por las disposiciones contenidas en la reglamentación aplicable al establecimiento de salud.
- 9.3** Los principales registros generados en la aplicación del presente manual son los siguientes:
- 9.3.1** Formulario de solicitud de examen.
 - 9.3.2** Rotulado de la muestra.
 - 9.3.3** Registro de la muestra en el laboratorio.
 - 9.3.4** Datos de las lecturas de las pruebas realizadas y reporte del diagnóstico.
 - 9.3.5** Lectura de los halos de inhibición (mm) de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.
 - 9.3.6** Registros de los controles de calidad.
 - 9.3.7** Registros del control de operación de los equipos.
 - 9.3.8** Registros de calibración y mantenimiento de equipos y medios de medición.

9.4 Formulario de solicitud de examen

- 9.4.1** El formulario de solicitud de examen, debe ser llenado con letra clara y es firmado por la persona que tomó la muestra e incluye los siguientes datos:
- a) Fecha de solicitud.
 - b) Nombre, edad y sexo del paciente.
 - c) Número de cama (cuarto o sala).
 - d) Tipo de muestra.
 - e) Examen solicitado.
 - f) Sospecha clínica.
 - g) Enfermedad de base.
 - h) Información sobre uso de antimicrobianos.
 - i) Hora de la obtención de la muestra(*).
 - j) Médico solicitante.
 - k) Responsable de la obtención de la muestra.

- l) Para infecciones del torrente sanguíneo se registra la temperatura del paciente al momento de la obtención de muestra. En caso de muestra seriadas, indicar si es primera, segunda o tercera muestra. (Ej. Hemocultivo, urocultivo y otros.)

(*) Es un dato bastante importante en el control de la calidad y análisis de la viabilidad de la muestra.

9.5 Rotulado de la muestra

El personal responsable de la obtención de muestra se asegura de identificar las muestras con los datos de los pacientes. Cada muestra se rotula con la siguiente información:

- a) Código de identificación del paciente
- b) Tipo de muestra
- c) Fecha y hora
- d) En infecciones del torrente sanguíneo anotar el número de hemocultivo tomado.

BIBLIOGRAFIA

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

15. Lauderdale T, Chapin K, Murray P. Reagents. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 1665 – 1673
16. Mc Faddin J. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. México DF:Editorial Médica Panamericana 1991
17. Miller J. Michael, Holmes H. Specimen collection, transport and storage. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 33 – 63
18. Ministerio de salud. Protocolo: *Estudio de prevalencia de infecciones intrahospitalarias*. Documento técnico (OGE – RENACE / VIG. HOSP. DT 001-99V.1)1999/ Lima Perú
19. Ministerio de Saúde. *Vigilância Epidemiológica por componentes NNIS*. Título original: National Nosocomial Infection Surveillance System (NNIS) Information packet. 1994. Brazil
20. NCCLS. *Performance standards for antimicrobial disk Susceptibility Test: Approved Standard*. 7° Ed M2-A7. 17(1) 2000
21. NCCLS *Disk Diffusion Supplemental tables M100-S11*. 21(1) 2001
22. OPS. Vol IV *Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias*. Serie HSP/ Manuales Operativos Paltex. N°13, USA. 1996
23. Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L , Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 64 – 104
24. SCIHSCSP, 1997 En: Miller J.M. *A guide for specimen management in clinical microbiology*. American Society for Microbiology: USA. 1996
25. Tenover F, Mc Gowan J. *Antibacterial resistance*. Inf Dis Clin N Am.1997, Vol 11 (4): 757 - 887

ANEXO A

PRUEBAS BIOQUIMICAS: RECOMENDACIONES

A.1 PRUEBA DE CATALASA

A..1.1 Reactivo

Peróxido de hidrógeno 3%

A..1.2 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.

A.2 PRUEBA DE COAGULASA:

A..2.1 Reactivo: Plasma de conejo deshidratado

A..2.2 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.

A.3 PRUEBA DE OXIDASA

A.3.1 Reactivos

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

A.3.2 Recomendaciones

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

A.4 AGAR BILIS ESCULINA

A.4.1 Preparar 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 / pulg², 15 minutos.
- Enfriar manteniendo el tubo inclinado de tal manera que se obtenga una buena superficie en pico de flauta).
- Conservar refrigerado (4 – 10° C).

ANEXO B

METODO DE COLORACION DE GRAM

B.1 FIJACION DE LA MUESTRA:

Los frotis pueden ser fijados al calor o con metanol.

B.1.1 Al calor

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

B.1.2 Metanol:

La fijación por metanol previene la lisis de los glóbulos rojos brindando una visualización mas 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 lamina al aire.
- No usar calor antes de colorear.

B.2 PREPARACION DE COLORANTES

B.2.1 COLORACIÓN GRAM DE HUCKER

B.2.1.1 Cristal violeta

- **Cristal violeta: solución stock**

- | | |
|--|--------|
| - Cristal violeta (90 a 95% contenido del colorante) | 40 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 g |
| - Agua destilada | 1600 mL |

Disolver y mezclar en una 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 |

Filtrar la solución stock de cristal violeta en una botella de vidrio. Una vez que ha filtrado completamente, filtrar a continuación la solución de oxalato de amonio.

Rotular con la fecha de expiración más próxima de cualquiera de las soluciones stock.

B.2.1.2 Lugol de Gram

Cristal de yodo	1 gr
Yoduro de potasio	2 gr
Agua destilada	300 mL

Mezclar los cristales de yodo con el yoduro de potasio en un mortero.

Agregar el agua destilada en pequeñas cantidades.

Depositarlo en un frasco de vidrio oscuro.

Rotular con fecha de 6 meses de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente

Precaución:

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

B.2.1.3 Decolorante: alcohol – acetona (1:1)

Etanol 95%	500 mL
Acetona	500 mL

Mezclar el Etanol con la acetona

Depositarlo en un frasco de vidrio oscuro.

Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente

B.2.1.4. Colorante de contraste: Safranina

Safranina (certificada)	2.5 gr
Etanol (95%)	100 mL

En un mortero disolver 0,25 g de la safranina (certificada) en 10 mL de etanol (95%), seguidamente agregarle 90 mL de agua destilada.

Almacenar la solución preparada en un frasco oscuro.

B.2.1.5. Decolorante: alcohol – acetona (1:1)

Etanol 95%	500 mL
Acetona	500 mL

Mezclar el Etanol con la acetona

Depositarlo en un frasco de vidrio oscuro.

Rotular con fecha de un año de expiración.

Almacenar a temperatura ambiente

B.2.1.6 Procedimiento

- Preparar un extendido fino del material en estudio y dejarlo secar al aire.

- Fijar el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando rápidamente el portaobjeto 3 o 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 100 x de inmersión (aceite).

B.2.2 COLORACION GRAM - MODIFICACIÓN DE KOPELOFF

B.2.2.1. Cristal violeta alcalino

(1) Solución A

Cristal Violeta	10 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 g
Agua destilada	1000 mL

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

Almacenar a temperatura ambiente.

B.2.2.2. Solución de Lugol

Hidróxido de sodio	4 g
Agua destilada	25 mL
Cristales de yodo	20 g
Yoduro de potasio	1 g
Agua destilada	925 mL

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.

B.2.2.3. 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.

B.2.2.4. Colorante de Contraste: Safranina

Safranina O, certificada	20 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.

B.2.2.5. 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 mas 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.

ANEXO C

MEDIOS : PREPARACION Y RECOMENDACIONES

C.1 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 / pulg² 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).

C.2 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 / pulg² por 15 minutos.
- Enfriar en posición inclinada (pico de flauta) con una capa basal profunda.

C.3 AGAR LISINA HIERRO

- Preparar de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- Autoclavar a 121°C, 15 libras / pulg² 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.

C.4 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 / pulg² 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 0.45µm).
 - De no contar con los filtros se puede esterilizar la urea por tindalización.

C.5 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 ± 0.2 .
- Repartir en tubos de 4 mL a 5 mL en tubos de tapa rosca y autoclavar.
- Conservar refrigerado ($4 - 10^{\circ} \text{C}$).

C.6 CALDO MR VP

C.6.1 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 / pulg², 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.

C.6.2 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 / pulg², 15 minutos.
 Conservar refrigerado 4°C a 10°C .
- α naftol al 5 %
- KOH al 40%.

C.7 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 / pulg², 15 minutos.
- Enfriar en posición vertical, ajustar las tapas y refrigerar a $4 - 10^{\circ} \text{C}$.
- Conservar los tubos con gelatina refrigerados hasta el momento de su inoculación.

C.8 PRUEBA DE INDOL

C.8.1 Medios y reactivos:

- Caldo de triptófano o de peptona o caldo de triptona.
 - Preparar de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
 - Distribuir en tubos, aproximadamente 4 mL por tubo.
 - Autoclavar a 121° C, 15 libras / pulg², 15 minutos.
 - Conservar refrigerado.
- Reactivo de indol de Kovacs
 - Alcohol amílico o isoamílico (puede sustituirse por alcohol butílico) 150 mL
 - p-dimetilamino-benzaldehído 10 g
 - HCl concentrado 50 mL

C.8.2 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

C.8.3 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.

C.9 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 / pulg², 15 minutos.
- Distribuir aproximadamente 5 mL por tubo.
- Solidificar el medio en posición vertical y conservar refrigerado (4 – 10° C)

C.10 PRUEBA DE REDUCCION DE NITRATO

Medios y Reactivos

- **Caldo Nitrato**
 - Preparar de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
 - Repartir 1 mL por tubo.

- Autoclavar a 121° C, 15 libras / pulg², 15 minutos.
- Conservar los medios refrigerados a 4 – 10° C

- **Reactivo A:**

- α -naftilamina 5 g
- Dimetil- α naftilamina 6 g
- Acido acético (5N), 30% 1000 mL

Procedimiento

- Disolver cualquiera de las sustancias en menos de 1000 mL de ácido acético 5 N 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 5 N.
- Filtrar la solución.
- Guardar refrigerado (4° C) en un frasco ámbar.

- **Reactivo B:**

- Acido sulfanílico (ácido para aminobenzenosulfónico) 8 g
- Acido acético (5N), 30% 1000 mL

Procedimiento

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

C.11 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 / pulg², 15 minutos.
- Enfriar manteniendo el tubo inclinado de tal manera que se obtenga una buena superficie en pico de flauta).
- Conservar refrigerado (4 – 10° C).

C.12 CALDO PARA LAS PRUEBAS DE CARBOHIDRATOS

Medios y reactivos

- Caldo infusión corazón 90 mL
- 10% de carbohidrato en agua 10 mL
- Púrpura de bromocresol, (1,6% en etanol 95%), 0,1 mL
- 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 – 10° C).

C.13 MEDIOS PARA HEMOCULTIVOS

C.13.1 MEDIO MONOFASICO:

Materiales y medios:

Caldo Trypticase Soya o Infusión cerebro corazón
Polyanetol sulfonato de sodio (SPS)
Gelatina
Frascos de vidrio de 150mL ó 125mL
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 90mL en frascos de 150 mL y 45 mL en frascos de 125 mL.
- Colocar el tapón de jebe y asegurarlo con cinta maskintape 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 masking tape.
- Asegurar los tapones de jebe 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.

C.13.2. MEDIO BIFASICO:

- **Materiales:**

Frascos de vidrio
Tapones de jebe
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 Trypticase 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 jebe y los precintos de metal.
- Se controla la esterilidad del medio por una semana a 35 – 37° C.

ANEXO D

FICHA PARA ENVIO DE CEPAS

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PUBLICA	Capac Yupanqui 1400 Lima 11 Tel: 4719920 Anexo: 165- 143 Telefax: 471-2529
HOSPITAL:	
CODIGO DE UDS.	
NOMBRE o INICIALES DEL PACIENTE:	
EDAD:	SEXO :
DIAGNOSTICO CLINICO:	
TIPO DE MUESTRA	
DIAGNOSTICO DE LABORATORIO:	
PRUEBAS BIOQUIMICAS REALIZADAS:	

RESULTADO DE SU ANTIBIOGRAMA			
ANTIBIOTICO	Concentración del disco	Lectura (mm)	Interpretación

FECHA DE AISLAMIENTO:
FECHA DE SIEMBRA EN EL MEDIO:
FECHA DE ENVIO DE CULTIVO BACTERIANO

F1-MPR-CNLSP-004