	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	1 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

I. INTRODUCCIÓN

Los profesionales que trabajamos en Laboratorio de Microbiología, tenemos la responsabilidad de entregar al médico, y a los pacientes que concurren al mismo, resultados que sean precisos. Para lograr estos resultados con precisión diagnóstica, hay que considerar que el proceso analítico se inicia con la preparación del paciente, continúa con la obtención y el manejo de la muestra biológica en el laboratorio, y finaliza con el reporte de un informe.

1. OBJETIVOS

El presente documento describe el proceso microbiológico con la finalidad de realizar el apoyo al diagnóstico clínico e instruir a pacientes y personal sobre los cuidados que deben tener presentes previas a la toma de la muestra y al proceso mismo.

El propósito esencial de la sección de bacteriología clínica proporciona guías para el aislamiento e identificación de los microorganismos causantes de diversas enfermedades proporcionando la información necesaria sobre la sensibilidad a los antibióticos para la selección de una adecuada terapéutica.

2. CAMPO DE APLICACIÓN

Este manual se aplica al proceso microbiológico de todas las muestras referidas a la unidad de bacteriología.


3. REQUISITOS GENERALES

3.1 Local

- a) El laboratorio de Bacteriología debe ser un área apartada de las otras secciones, espaciosa como para poder mantenerse limpias y ordenadas.
- b) Debe ser un ambiente cerrado, y se debe tomar las medidas necesarias para reducir al mínimo el riesgo de contaminación.
- c) Los equipos y material de laboratorio no deben moverse habitualmente entre las distintas áreas, para evitar una contaminación cruzada accidental.
- d) Debe ser un ambiente con mesón de material apropiado para soportar los líquidos desinfectantes como el Hipoclorito de Sodio u otros (y no corroerse).

3.2. Equipos

- a) Estufas.
- b) Cabina de seguridad microbiológica.
- c) Autoclave.
- d) Homogeneizador.
- e) Refrigeradores.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 2 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	CODIGO
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	


- f) Balanza.
- g) Phmetro.
- h) Microscopio.
- i) Centrifuga para tubos.
- j) Camilla para toma de muestra.
- k) Mecheros.
- l) Computadora e impresora.

3.3. Materiales

- a) Recipientes de vidrio o plástico.
- b) Matraces.
- c) Tubos de ensayo.
- d) Placas Petri de cristal o plástico.
- e) Instrumentos de muestreo, asas y agujas de siembra de platino, níquel/cromo o material de plástico desechable.
- f) material volumétrico, como pipetas.
- g) dispensadores automáticos.
- h) instrumentos de medida, como termómetros, cronómetros.
- i) Porta objetos.
- j) Cubre objetos.
- k) Gradillas.
- l) Tubos cónicos.
- m) Pipetas Pasteur de plástico.
- n) Bandeja de acero inoxidable (sol. hipoclorito de sodio al 10%) o plástica.
- o) Material de protección (guantes de látex, barbijo, gorro, guardapolvo, lentes protectores).
- p) Ropa de trabajo.

3.4. Reactivos

- a) Reactivo de Kovacs.
- b) Peróxido de hidrogeno.
- c) Reactivo de PYR (l pirrolidonil – betanaftilamida).
- d) Tinción de Gram.
- e) Tinción de Zielh Neelsen.
- f) Tinción May greagwald Giemsa.
- g) Isovitalex.
- h) Discos de identificación bacteriana.
- i) Discos de antibiograma.
- j) Tiras reactivas para orina.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	3 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

3.5. Medios de Cultivo

Son ambientes artificiales que contienen los elementos nutritivos y las condiciones físico-químicas que permiten el desarrollo, crecimiento, conservación y estudio de los microorganismos. Existen diferentes medios de cultivo (tipos):

- a) **Cultivos Comunes:** Son los que contienen un medio base (Agar – Agar) para el desarrollo de microorganismos.
- b) **Cultivos Enriquecidos:** Son aquellos medios destinados a lograr un crecimiento rápido de ciertos gérmenes; por Ej. Agar – Sangre; Agar – Chocolate; Agar – Cerebro – Corazón ; Caldo de tetratoato; caldo soya tripticasa, etc.
- c) **Cultivos Selectivos:** Son aquellos medios que permiten el desarrollo de un determinado microorganismo, impidiendo el desarrollo de otros, por Ej. Salmonella – Shigella; etc.
- d) **Cultivos Diferenciales:** Son aquellos medios, como la urea, el citrato, el indol, SIM, Mac conkey, EMB (eosina azul de metileno, etc., que contienen una sustancia que al combinarse con algún producto del metabolismo bacteriano producen una reacción característica (por Ej. Un cambio de color) que permitirá su identificación.


La selección de los medios de cultivo, así como el procedimiento de aislamiento a seguir, dependen del agente etiológico que se esté investigando o la búsqueda se concentra en los patógenos habituales de acuerdo a la muestra en estudio.

3.6 Desinfectante

- a) Solución de Hipoclorito de Sodio al 5%.
- b) Alcohol al 70 %.

4. OPERACIONES PRELIMINARES

- a) Verificar la temperatura de las estufas.
- b) Desinfectar el mesón de trabajo (sol de hipoclorito de sodio al 1%).
- c) Verificar la temperatura de los refrigeradores.
- d) Preparar el área de trabajo con el material necesario a utilizar: papel absorbente, gradilla con tubos de ensayo, portaobjetos y cajas petri con medios de cultivo.
- e) Realizar Inspección física de los medios de cultivo.
- f) Verificar condiciones de funcionamiento del microscopio.
- g) Verificar condiciones de funcionamiento de la centrifuga.
- h) Verificar estado de las muestras, identificación y numeración que corresponda con orden medica.
- i) Proceder de acuerdo a normas de bioseguridad.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	4 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

4.1 Muestras

Se requiere muestras de:

- a) Secreción faríngea.
- b) Secreción vaginal.
- c) Secreción uretral.
- d) Secreción bronquial o expectoración.
- e) Secreción nasal.
- f) Broncoaspirados.
- g) Líquidos: LCR, Articular, etc.
- h) Lavados gástrico, bronquial.
- i) Secreciones de heridas.
- j) Orina.
- k) Heces.
- l) Sangre.
- m) Raspado de lesiones dérmicas.

5. PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El diagnóstico microbiológico se basa en la observación de las muestras de acuerdo a su procedencia para realizar el proceso microbiológico específico, que también depende del espécimen a investigar.


5.1. Numeración y Registro de Todas las Muestras para el Área de Microbiología

- a) Ordene las muestras de acuerdo a la numeración establecida en la orden médica.
- b) Enumerar en forma correlativa de acuerdo al cuaderno de registro de bacteriología con lapicero rojo, grande en el lado derecho de la papeleta médica.
- c) Registrar en el cuaderno de Bacteriología con ese mismo número, todos los datos necesarios como nombre y apellido del paciente, matrícula, médico solicitante, pieza o unidad (en caso de ser internado), procedencia, análisis requerido y motivo de la consulta.
- d) Una vez registradas las papeletas, o procesadas en caso de orinas, pasar a secretaria para su registro.

5.2. Tipos de Diagnóstico Microbiológico

a) **Métodos directos: observación microscópica o preparación en fresco**

- Estos métodos permiten obtener información rápida o demostrar: la presencia de un Microorganismo o agente etiológico de la muestra sin teñir, para la búsqueda de hongos,

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	5 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

bacterias y parásitos. Comprende Examen Citológico al microscopio. (Visualización), con solución fisiológica, solución de KOH u otro liquido de acuerdo al procedimiento que se realice. Colocar en un tubo de ensayo (hemólisis) 1 o 2 ml de solución fisiológica y/o KOH.

- Colocar con un hisopo la muestra en estudio.
- Centrifugar a 2000 xg por 5 min.
- Desechar el sobre nadante y utilizar el sedimento colocando 1 gota en un porta objetos y cubrir con cubre objetos.
- Observar en microscopio con el objetivo de 40X.
- Se puede visualizar también otros elementos como hematíes, Leucocitos Polimorfo nucleares (PMN) y células epiteliales.
- La suspensión en KOH se utiliza preferentemente en la identificación de hongos. La muestra clínica (expectoración, raspado de piel o de tejidos) es mezclada con solución fisiológica o la solución de KOH al 10%, dejándola actuar por 1-15 minutos (se puede calentar suavemente, para acelerar la digestión de los tejidos).

b) Métodos indirectos: Preparación de un frotis bacteriano fijación y tinción simple

Preparación del frotis bacteriano y fijación:

- Rotular el portaobjetos a ser utilizado con el número del paciente en estudio.
- Preparar el extendido colocando la muestra sobre el portaobjetos con la ayuda de un hisopo o asa bacteriana respectivamente de acuerdo a la muestra en estudio.
- En caso de hacer el frotis bacteriano de un cultivo tomar material de la colonia elegida, con un asa previamente esterilizada a la llama y suspender este material en una gota de agua colocada en la mitad del portaobjetos. Extender el material sobre la superficie del portaobjeto.
- Dejar secar al aire junto a la llama del mechero.
- Fijar con calor pasando el preparado por sobre la llama del mechero tres veces.


Tinción de Gram:

Principio:

La coloración más utilizada para la detección de bacterias permite clasificar las bacterias en Gram+ y Gram- en función de su estructura de pared; a demás nos informa su morfología y disposición en el espacio, lo cual nos orienta hacia un diagnóstico.

Materiales:

- Set de tinción.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Soporte para teñir.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	6 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Procedimiento:

El tiempo de tinción con cada colorante varía según el reactivo utilizado y la marca

Tabla N° 1: Interpretación de resultados de tinción de Gram

Técnica	Elemento	Bacterias Gram-	Bacterias Gram+
1- Colorante	Violeta de Cristal	Color Violeta	Color Violeta
2- Mordiente	Lugol (Yodo)	Color Violeta	Color Violeta
3- Decolorante	Acetona + Alcohol	Se Decolora	No se Decolora
4- Contraste	Azul de Metileno	Color Rosado	Color Violeta

Fuente: Elaborado por Laboratorio Clínico, SSU-Cbba. 2010.

Coloración de Ziehl – Neelsen (Baciloscopía):

Principio:

Es útil para identificar BAAR (bacilos ácido alcohol resistentes), se basa en la propiedad que presentan estas bacterias para resistir la decoloración con un alcohol y un ácido fuerte, tras haber sido previamente teñidas.

Materiales:

- Set de tinción.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Soporte para teñir.

Procedimiento:

El tiempo de tinción con cada colorante varía según el reactivo utilizado y la marca.


	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	7 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Tabla Nº 2: Interpretación de resultados de Coloración de Ziehl – Neelsen (Baciloscopía)

Técnica	Elemento	BAAR	NO BAAR
1- Colorante	Fuccina	Color Rojo	Color Rojo
2- Mordiente	Calor	Color Rojo	Color Rojo
3- Decolorante	Acido Fuerte + Alcohol	Color Rojo	Decolora
4- Contraste	Azul de Metileno	Rojo sobre Azul	Azul

Fuente: Elaborado por Laboratorio Clínico, SSU-Cbba. 2010.

Tinción o Coloración Simple = (Maygrewald - Giemsa):

Principio:

Nos permite la visualización de leucocitos polimorfonucleares, mononucleares y visualización de eosinofilos en moco nasal.

Materiales:

- Set de tinción.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Soporte para teñir.

Procedimiento:

El tiempo de tinción con cada colorante varía según el reactivo utilizado y la marca


Interpretación de resultados:

Para el diagnostico de rinitis alérgica se realiza el recuento en porcentaje de la cantidad de eosinofilos en 100 elementos de la serie blanca.

Tinción con azul de metileno:

Principio:

Nos permite la visualización de leucocitos polimorfonucleares, mononucleares, morfología bacteriana y visualización de esporas e hifas de hongos.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	8 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Materiales:

- Set de tinción.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Soporte para teñir.

Procedimiento:

El tiempo de tinción puede variar de 3 a 5 minutos, se realiza con azul de metileno, cubriendo la placa con muestra completamente; se procede a lavar con abundante agua y se deja escurrir hasta secar. Observar con el objetivo de 100 y aceite de inmersión

Interpretación de resultados:

Esta tinción puede servir para observar esporas e hifas de hongos como: Pitiridiasis versicolor, diferentes especies de Cándida y otros hongos.

5.3. Aislamiento y Siembra Bacteriana

Procedimiento para obtener colonias aisladas estriando en placa:

➤ **Siembra por agotamiento**

- A. Flamear el asa.
- B. Obtener un inculó o colonia con ella (en forma estéril).
- C. Estriar con el asa en medio estéril contenido en una caja Petri, siguiendo uno de los modelos mostrados en D.
- D. Incubar a temperatura y tiempo adecuados.


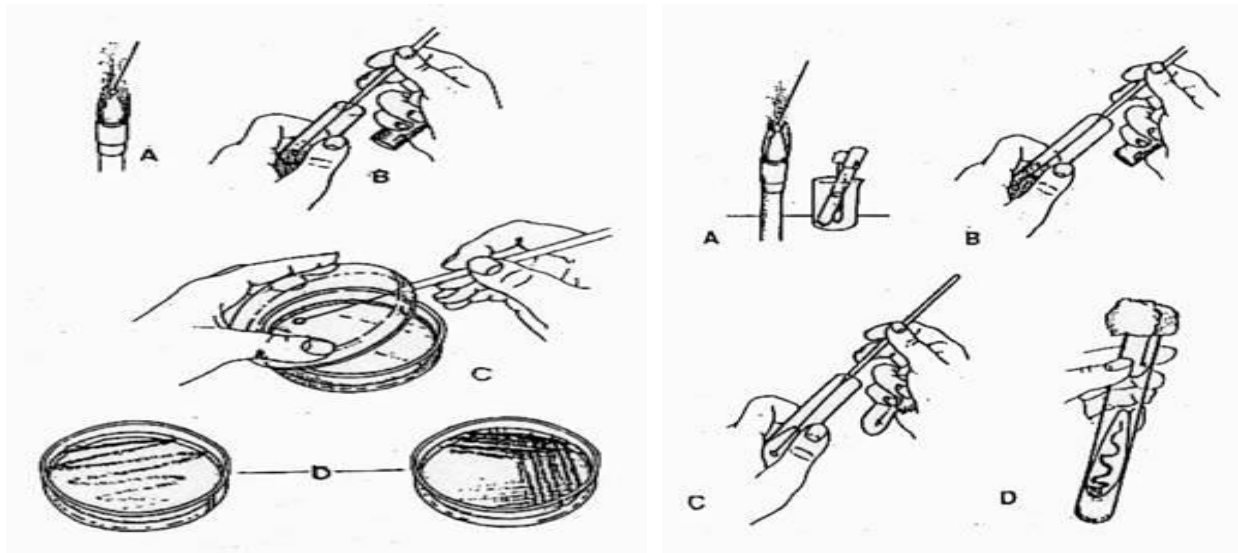
	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 9 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	9 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Figura N° 1: Siembra por agotamiento



➤ **Siembra en agar inclinado (pico de flauta) por estría**

- A. Flamear el asa o aguja bacteriológica.
- B. Obtener material a sembrar.
- C. Apoyar el asa sobre la superficie del agar y estriar con el diseño mostrado en D) o pinchar con la aguja bacteriológica tres cuartas partes del tubo en profundidad y estriar en la superficie del agar.
- D. Incubar a temperatura y tiempo adecuados.

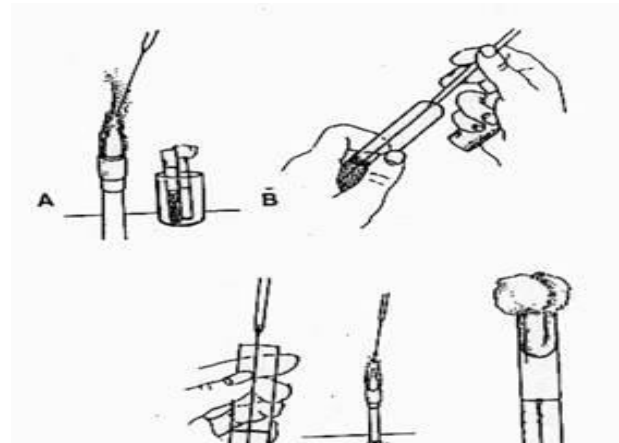



Figura N° 2: Siembra en Agar inclinado (pico de faluta) por estría.

➤ **Inoculación por punción**

- A. Flamear una aguja bacteriológica.
- B. Sumergirla una vez fría, en una suspensión bacteriana o la colonia en estudio.
- C. Punzar cuidadosamente en el centro del tubo hasta el fondo sin llegar a la base y retirarla cuidadosamente tratando de recorrer el mismo camino que para la inoculación.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	10 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- D. Flamear.
- E. Incubar el tubo a temperatura y tiempo adecuados.

➤ **Siembra masiva**

- A. Flamear el asa bacteriológica.
- B. Sumergirla una vez fría, en una suspensión bacteriana o la colonia en estudio.
- C. Apoyar el asa sobre la superficie del agar y estriar sin dejar espacio y masivamente.
- D. Flamear.
- E. Incubar el medio a temperatura y tiempo adecuados.

➤ **Siembra reticulada**

- A. Flamear el asa bacteriológica.
- B. Sumergirla una vez fría, en una suspensión bacteriana, orina, líquidos o la colonia en estudio.
- C. Apoyar el asa sobre la superficie del agar y estriar de manera reticulada (cuadros).
- D. Flamear.
- E. Incubar el medio a temperatura y tiempo adecuados.

➤ **Siembra en caldos**

- A. Sumergir un hisopo estéril en una suspensión bacteriana, orina, líquidos o la colonia en estudio.
- B. Colocar al caldo.

➤ **Siembra en medios sólidos a partir del caldo de cultivo**


- A. Flamear una pinza bacteriológica y sacar el hisopo que se encuentra en el caldo de enriquecimiento.
- B. Colocar una pequeña porción del mismo en el medio sólido que se desee usar de acuerdo al espécimen en estudio o la muestra a analizar.
- C. Flamear el asa bacteriológica, una vez fría, estriar la muestra
- D. Flamear.
- E. Incubar el medio a temperatura y tiempo adecuados.

6. IDENTIFICACIÓN DEL GERMEN

6.1. Pruebas de Identificación Bacteriana

Bacterias y hongos pueden ser identificados, tras su aislamiento en cultivos sólidos por:

- b) Las características Macroscópicas de la Colonia.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	11 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

c) Pruebas Bioquímicas Específicas para cada género microbiano.

6.2. Pruebas Bioquímicas

Se trata de un conjunto de reacciones basadas en el metabolismo de los microorganismos. Entre otros aspectos, se analiza la acción de la bacteria sobre los hidratos de carbono (qué fuente de carbono utiliza, en qué condiciones, cómo la utiliza, qué productos se obtienen), la liberación de exoenzimas, metabolitos y toxinas al medio de cultivo, la motilidad, etc.

A partir del conocimiento del metabolismo, las pruebas bioquímicas nos permiten determinar el género y la especie de la bacteria en estudio.

Esta identificación debe hacerse a partir de un cultivo puro y fresco (18-24 horas). Hay que tener en cuenta, además, que las características metabólicas de los microorganismos pueden variar en función de distintos factores de manera que para realizar una caracterización confiable es necesario realizar las pruebas en condiciones estandarizadas (en cuanto al inóculo, los reactivos, las condiciones de incubación y el tiempo de lectura) y utilizar más de una prueba en cada caso.

La elección de las mismas se hará en base a la familia en estudio, lo cual se irá determinando en el curso del aislamiento.

Las pruebas más comúnmente utilizadas son:

a) Prueba de oxidasa

Principio:


- Esta prueba sirve para la determinación de la presencia de la enzima citocromo oxidasa en preparaciones de microorganismos.
- Permite diferenciar enterobacterias, distintas especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* (-) de algunas especies de *Pseudomonas* u *Aeromonas* (+).

Materiales y Reactivos:

- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas en agar nutritivo.
- Discos de oxidasa (dimetilparafenilendiamina).
- Aplicadores de madera (palitos de madera).
- Mechero.
- Agua destilada.

Procedimiento:

- En un portaobjetos colocar el disco de oxidasa con la ayuda de un aplicador o palito de madera.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	12 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Colocar sobre el disco una gota de agua destilada estéril.
- Levantar con el aplicador de madera una colonia del cultivo.
- Aplicar dicha colonia sobre el disco de oxidasa, asegurándose de extender bien el material.
- Esperar 3-5 minutos y observar la coloración.

Interpretación de resultados:

- Prueba positiva: el disco vira al color rosado a morado e inclusive purpura intenso.
- Prueba negativa: el disco no cambia de color.

b) Prueba de catalasa

Principio:

- La prueba permite comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo, la excepción principal es *Streptococcus*.
- La enzima catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. La liberación de oxígeno se observa por la formación de burbujas.

Permite diferenciar:

- **Géneros:** *Streptococcus* (-) de *Micrococcus* (+) y/o *Staphylococcus* (+); *Bacillus* (+) de *Clostridium* (-) y *Corynebacterium* (+) de *Erysipelothrix* (-), siendo excepciones en este último caso, *Corynebacterium pyogenes* (-) y *Corynebacterium haemolyticum* (-).
- **Especies:** *Moraxella bovis* (variable) y *Moraxella kingii* (-) de otras especies de *Moraxella* (+).

Materiales y Reactivos:


- Portaobjetos.
- Peróxido de hidrógeno al 3% (10 vol.).
- Aplicadores estériles.

Procedimiento:

- Con una aguja o asa bacteriológica recoger una colonia de un cultivo puro de 18 a 24 hrs de incubación (de la parte central de la colonia evitando arrastrar el medio).
- Colocar la colonia en un portaobjetos.
- Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre la colonia.

Lectura:

- Inmediatamente, observar la formación de burbujas.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	13 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Interpretación:

- La formación de burbujas por liberación de oxígeno indica una reacción positiva.
- La ausencia de burbujas indica una reacción negativa.

c) Prueba de la coagulasa

Principio:

- La coagulasa es un enzima capaz de desnaturalizar la fibrina del plasma. La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* patógenas (enterotoxigénicas) producen esta enzima.
- Permite diferenciar el *Staphylococcus aureus* de otros *Staphylococcus*.

Materiales y medios de cultivo:

- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas en agar nutritivo.
- Asa bacteriológica.
- Tubo de ensayo con plasma citratado.

Procedimiento:

- Se añade una suspensión densa de bacterias a un tubo pequeño con plasma y se incuba de 35 a 37 °C.
- Se observa la coagulación entre las 4 y 24 h.

Interpretación de resultados:

- Prueba positiva: coagula el plasma.
- Prueba negativa: plasma no coagulado.


d) Prueba del agar hierro triple azúcar (TSI)

Principio:

- Permite determinar la capacidad de un microorganismo de metabolizar los hidratos de carbono incorporado a un medio de crecimiento básico, así como la de producir gas y ácido sulfhídrico.
- Se utiliza para identificar diferentes especies bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*.

Materiales y medios de cultivo:

- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas en agar nutritivo.
- Tubos en pico de flauta con agar triple azúcar hierro.
- Aguja bacteriológica.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	14 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Procedimiento:

- Inocular cada uno de los microorganismos aislados por punción y por estría en el mismo tubo de medio agar TSI (ver siembra y aislamiento).
- Incubar de 35 a 37 °C durante 18-24 horas.
- Observar entre las 18 horas y las 24 horas de cultivo (ni antes ni después).

Interpretación de resultados:

La utilización de un hidrato de carbono implica la liberación al medio de productos ácidos capaces de ser detectados por un indicador de pH. Si el microorganismo es incapaz de utilizar el hidrato de carbono, consume las peptonas del medio liberando productos que alcalinizan el medio.

Cuando se interpretan los resultados de esta prueba deben analizarse los siguientes aspectos:

- Utilización del hidrato de carbono:

Si el microorganismo en estudio sólo fermenta la glucosa:

En superficie: reacción alcalina, color rojo.

En profundidad: reacción ácida, color amarillo.

Si el microorganismo en estudio es capaz de fermentar tanto la glucosa como la lactosa:

En superficie: reacción ácida, color amarillo.

En profundidad: reacción ácida, color amarillo.

Si el microorganismo en estudio no es capaz de fermentar la glucosa ni la lactosa (no entérico):

En superficie: reacción alcalina, color rojo.

En profundidad: si el microorganismo es aerobio no se observa crecimiento ni cambio de color; si el microorganismo es facultativo, reacción alcalina, color rojo.


Si el microorganismo en estudio no es capaz de fermentar la glucosa pero si de oxidarla:

En superficie: reacción ácida a tiempos cortos y luego alcalina, color rojo.

En profundidad: no se observa crecimiento ni cambio de color.

- Producción de gas:

Si el microorganismo en estudio es aerogénico, la producción de H₂ y CO₂ se manifiesta mediante la formación de una o varias burbujas o el desprendimiento del medio del fondo del tubo dejando un área clara.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	15 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Si el microorganismo en estudio es anaerogénico, no hay producción de gases.

- Producción de ácido sulfhídrico (SH₂):

Si el microorganismo en estudio produce este ácido, se manifestará por la presencia de un precipitado negro de sulfuro de hierro en la parte profunda del tubo.

Si el microorganismo en estudio no produce este ácido, se manifestará por la ausencia de dicho precipitado.

- Motilidad:

Si el microorganismo en estudio es móvil (+), el crecimiento se aleja de la línea de punción.

Si el microorganismo en estudio no es móvil (-), crecimiento limitado a la línea de punción.

e) Investigación de la producción de Indol, Motilidad y sulfuro de hidrogeno

Principio:


- Con esta prueba bioquímica se mide la capacidad del microorganismo de metabolizar el triptófano y producir indol.
- Sirve para diferenciar *Escherichia coli* y distintas especies del género *Edwardsiella* (+) de especies de los géneros *Salmonella*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (-).
- Permite analizar la capacidad de movimiento del microorganismo en estudio. En general, las bacterias móviles son bacilos flagelados (especies de *Bacillus*, *Enterobacter* y *Vibrio*). Sin embargo, algunas formas de cocos son también móviles.
- También determina la capacidad de la bacteria de reducir el tiosulfato a H₂S para reducir la tensión de oxígeno. El H₂S se combina con sales de hierro y forma un precipitado negro.

Materiales:

- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas en agar nutritivo.
- Tubos con medio de cultivo SIM.
- Aguja bacteriológica.
- Reactivo de Kovacs (p-dimetilamino benzaldehído).

Procedimiento:

- Inocular el tubo conteniendo el medio SIM, los microorganismos aislados por punción.
- Incubar de 35 a 37 °C durante 24 horas.
- Determinar la presencia de indol utilizando el reactivo de Kovacs.
- Para ello, colocar en el tubo de ensayo 3 gotas del reactivo de kovacs y dejar reposar hasta la formación de un anillo, la reacción debe ser leída dentro de los dos minutos de agregado el mismo.
- Observar coloración.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	16 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Interpretación de los resultados:

Formación de indol:

Prueba positiva: un anillo rojo en la superficie del medio en la capa alcohólica (corresponde a la formación de un compuesto quinónico coloreado derivado del indol).

Prueba negativa: anillo amarillo en la superficie del medio en la capa alcohólica (ausencia de indol en medio de cultivo).

Resultado de motilidad:

Prueba positiva: los organismos móviles migran de la línea de siembra y difunden en el medio provocando turbiedad.

Prueba negativa: crecimiento bacteriano en la línea de siembra, el medio circundante se mantiene claro.

Producción de sulfuro de hidrogeno:

Prueba positiva: color negro.

Prueba negativa: no cambia de color.

f) Investigación del aprovechamiento de citrato

Principio:


- Se usa para determinar la capacidad del microorganismo para utilizar citrato como única fuente de carbono.
- Permite diferenciar especies de *Salmonella*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (+) de *Escherichia coli* y especies de *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Actinobacillus* (-).

Materiales:

- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas.
- Tubos con medio de citrato.
- Aguja bacteriológica.

Procedimiento:

- Inocular los microorganismos aislados por punción y por estría en el mismo tubo de medio agar citrato.
- Incubar de 35 a 37°C durante 24 horas.
- Observar cambio de color del medio.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 17 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

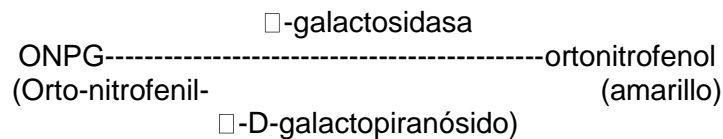
Interpretación del resultado:

- Prueba positiva: El consumo del citrato produce un aumento de pH y un viraje del indicador de verde a azul.
- Prueba negativa: color verde.

g) ONPG: determina la actividad de la enzima B-galactosidasa

Principio:

- Esta enzima hidroliza la lactosa originando glucosa y galactosa.
- Para conocer si un microorganismo posee β -galactosidasa se utiliza como sustrato un compuesto orgánico, ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactósido), que presenta el mismo tipo de enlace de la galactosa que en la lactosa, éste, al ser hidrolizado, libera o-nitrofenol que es de color amarillo, mientras que el ONPG es incoloro.



- La prueba se utiliza para diferenciar los microorganismos fermentadores lentos de lactosa de la lactosa negativo. Ej. E.coli +, Citrobacter +, Salmonella -, Proteus -, Shigella -.
- Algunas especies de Pseudomonas son ONPG [+] y otras [-].

Materiales:


- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas.
- Tubos de ensayo.
- Agua destilada estéril.
- Disco ONPG.

Procedimiento:

- Inocular los microorganismos aislados en un tubo con agua destilada o solución fisiológica estéril hasta tener una concentración densa.
- Colocar el disco de ONPG dentro del tubo de ensayo.
- Incubar a 37 ° C por 24 horas para la lectura.

Interpretación del resultado:

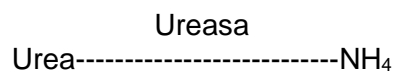
- Reacción positiva: amarillo.
- Reacción negativa: incoloro.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 18 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

h) UREA

Principio:

- Determina la actividad de la enzima ureasa.



- El amonio produce un cambio de pH y un viraje del indicador de amarillo a rojo si se observa entre las 18 hs. y las 24 hs.

Materiales:

- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas.
- Tubos con medio con urea.
- Aguja bacteriológica.

Procedimiento:

- Inocular los microorganismos aislados por punción y por estría en el mismo tubo de medio agar urea.
- Incubar de 35 a 37°C durante 24 horas.
- Observar cambio de color del medio.


Interpretación del resultado:

- Reacción positiva: rojo o naranja.
- Reacción negativa: amarillo.

i) Prueba de la optoquina

Principio:

La optoquina es un compuesto químico, clorhidrato de etilhidrocupreina, impregnado en discos de papel filtro a una concentración de 5 µg que inhibe el crecimiento del *Streptococcus pneumoniae*. Es completamente soluble en agua y se difunde rápidamente en el medio. Las colonias de *S. pneumoniae* alrededor del disco son lisadas debido a cambios de tensión superficial, produciendo una zona de inhibición.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 19 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Materiales:

Discos de optoquina (5 µg)
Placa de agar sangre
Asa bacteriológica

Procedimiento

Con la ayuda de un asa estéril tomar una a dos colonias aisladas y de forma homogénea estriar la placa de agar sangre con siembra masiva.

- Con una pinza, colocar un disco de optoquina sobre la siembra realizada.
- Aplicar una suave presión al disco para que éste se adhiera (teniendo cuidado de no hundir en el medio).
- Incubar a 35 a 37°C con 5 – 7% de CO₂ durante 18 a 24 hrs.

Lectura:

- Medir en milímetros el diámetro de la zona clara de inhibición.

Interpretación de resultados:

- Discos de 6 mm: Halo de inhibición ≥ 14 mm indica sensibilidad. *Prueba Positiva.*
Halo de inhibición de 6 a 13 mm sensibilidad dudosa.
- Discos de 10 mm: Halo de inhibición de ≥ 16 mm indica sensibilidad. *Prueba positiva.*
Halo de inhibición de 10 a 15 mm indica sensibilidad dudosa.

j) Prueba de la Bacitracina


Principio:

- Se utiliza en la identificación presuntiva de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A de Lancefield que suelen ser sensibles a bajas concentraciones de este antibiótico.

Materiales:

- Discos de Bacitracina (0,04 U).
- Placa de agar sangre.
- Asa bacteriológica.

Procedimiento:

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	20 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Con la ayuda de un asa estéril tomar una a dos colonias aisladas y de forma homogénea estriar la placa de agar sangre con siembra masiva.
- Con una pinza, colocar un disco de bacitracina sobre la siembra realizada.
- Aplicar una suave presión al disco para que éste se adhiera (teniendo cuidado de no hundir en el medio).
- Incubar a 35 - 37 °C con 5 – 7% de CO₂ durante 18 a 24 hrs.

Lectura:

- Medir en milímetros el diámetro de la zona clara de inhibición.

Interpretación de resultados:

- Reacción positiva: sensibilidad.
- Reacción negativa: resistencia.

k) Prueba del CAMP

Principio:

- Prueba presuntiva de *Streptococcus del grupo B*. Se basa en la potenciación de la zona de lisis formada por *Staphylococcus aureus* productores de β-lisina por el denominado factor CAMP de los *Streptococcus tipo B*.

Materiales:


- Cepa de *Staphylococcus aureus*.
- Placa de agar sangre.
- Asa bacteriológica.

Procedimiento:

- Con la ayuda de un asa estéril tomar una a dos colonias aisladas de los *Streptococcus tipo B* y de forma homogénea estriar media placa de agar sangre con siembra masiva.
- En sentido perpendicular colocar una estría de *Staphylococcus* casi al borde de la siembra del estreptococo.
- Incubar a 35^a 37 °C durante 18 a 24 hrs.

Interpretación de resultados:

- Reacción positiva: se forma una hemolisis alrededor de la cepa de estafilococo en forma de flecha.
- Reacción negativa: no se observa la hemolisis

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 21 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

l) Sensibilidad a Novobiocina

Principio:

- Se utiliza para diferenciar las especies de Staphylococcus coagulasa negativas.

Materiales:

- Discos de novobiocina.
- Placa de agar sangre.
- Asa bacteriológica.

Procedimiento:

- Con la ayuda de un asa estéril tomar una a dos colonias aisladas y de forma homogénea estriar la placa de agar sangre con siembra masiva.
- Con una pinza, colocar un disco de Novobiocina sobre la siembra realizada.
- Aplicar una suave presión al disco para que éste se adhiera (teniendo cuidado de no hundir en el medio).
- Incubar a 35° a 37 °C durante 18 a 24 hrs.

Interpretación de resultados:

- Se considera sensibilidad positiva cuando el halo de Inhibición del crecimiento es superior a 16 mm.
- Se considera resistencia si el desarrollo bacteriano llega hasta el disco de Novobiocina.


m) Descarboxilasas de aminoácidos (arginina, lisina, ornitina)

Principio:

- Los aminoácidos al perder el grupo carboxilo se convierten en aminas lo que incrementa el pH del medio y el indicador (púrpura del bromocresol) vira a violeta.
- Las descarboxilasas son útiles en la diferenciación de enterobacterias.

Materiales:

- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas.
- Tubos con medio de cultivo específico.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 22 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Procedimiento:

Las bacterias se inoculan en medios complejos que contienen lisina, ornitina o arginina al 1% y un indicador de pH (púrpura de bromocresol).

Interpretación del resultado:

- Reacción positiva: purpura.
- Reacción negativa: amarillo.

n) Hemolisis (Agar Sangre)

Principio:

- Medio de cultivo enriquecido con la adicción de sangre.
- Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes.
- Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes.

Materiales:

- Cultivos puros de bacterias crecidos 18-24 horas.
- Tubos con agar sangre.

Procedimiento:

- Se siembra por agotamiento en estría en placas de agar sangre.
- Incubar a 35° a 37 °C durante 18 a 24 hrs.


Interpretación del resultado:

- Reacción positiva: presencia de hemolisis.
- Reacción negativa: ausencia de hemolisis.

ñ) Prueba de la oxacilina

Principio:

- Las penicilinas y cefalosporinas actúan uniéndose e inhibiendo la acción de las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular bacteriana llamadas proteínas ligadoras de penicilina (PLP o PBP).

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	23 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- La prueba de difusión en agar o método de Bauer Kirby se basa en la formación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de un disco de papel filtro impregnado con antimicrobiano a probar (oxacilina 1 ug).
- La oxacilina es una penicilina isoxazólica semisintética, ácido estable y de degradación lenta que se emplea para determinar la susceptibilidad a la penicilina.

Materiales:

- Hisopos estériles.
- Pinzas estériles o dispensador.
- Agar Mueller – Hinton.
- Tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland.

Procedimiento:


- A partir de un cultivo puro de 18 a 24 hrs de *Streptococcus pneumoniae*, o la bacteria en estudio tomar varias colonias.
- Colocarlas directamente en solución fisiológica estéril.
- Ajustar la suspensión a una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland.
- Inmediatamente después, humedecer el hisopo estéril en el tubo, rotarlo y presionarlo contra las paredes, para eliminar el exceso de la suspensión.
- Inocular en la superficie seca de las cajas de Agar MH, estriando la superficie en tres direcciones.
- Colocar los discos con los antimicrobianos a probar, presionando suavemente, en la superficie inoculada con pinzas o dispensador.
- Incubar en una atmósfera de 5 a 7% de CO₂ a 35 °C durante 20 a 24 hrs en caso del estreptococo, para el estafilococo no se necesita CO₂

Lectura:

- Medir los diámetros de completa inhibición de crecimiento.
- **NO** medir la zona de hemólisis.

Interpretación:

- Un halo de inhibición mayor o igual a 20 mm indica que el microorganismo es susceptible a la oxacilina, es decir que puede considerarse susceptible a penicilina, ampicilina amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina/sulbactam, cefalosporinas de 1^o, 2^o y 3^o generación, imipenem y loracarbef.
- Un halo de inhibición menor o igual a 19 mm indica una resistencia franca o susceptibilidad disminuida a la penicilina, por lo que deberá determinarse la CIM.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	24 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

o) Producción de beta-lactamasas o test de Cefinace

Principio:

- Los antibióticos beta-lactámicos actúan sobre la pared bacteriana actuando como un bacteriostático y luego bactericida.
- Este efecto antimicrobiano se ve limitado por algunos microorganismos que producen beta-lactamasa entre los cuales tenemos al *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis* estas enzimas rompen el anillo beta lactámico con la producción de ácido penicilinoico, lo que produce muchos fracasos terapéuticos con el uso de penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas.
- El método cromogénico se basa en el cambio de color de amarillo a rojo de una cefalosporina cromogénica (nitrocefina) cuando la fracción amida del compuesto unida al anillo beta lactámico es hidrolizado por la beta-lactamasa.

Materiales:

- Agua destilada estéril.
- Discos impregnados con cefalosporina cromogénica (Nitrocefina – Cefinase).

Procedimiento:

- Colocar el disco en un portaobjetos limpio y humedecer con agua destilada estéril.
- Con un asa estéril, levantar una colonia aislada y frotarla sobre la superficie del disco.

Lectura:

- Observar el cambio de color en la superficie del disco.

Interpretación:

- La presencia de un color rosado en la superficie del disco indica un resultado positivo, es decir que el microorganismo estudiado produce beta-lactamasa.
- La ausencia de un cambio de color en el disco indica un resultado negativo.


p) Prueba de sensibilidad Sulfatrimetropim

Principio:

- Se utiliza en la identificación presuntiva de los estreptococos β -hemolíticos del grupo A de Lancefield que suelen tener resistencia natural a este antibiótico.

Materiales:

- Discos de sulfatrimetropim.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	25 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Placa de agar sangre.
- Asa bacteriológica.

Procedimiento:

- Con la ayuda de un asa estéril tomar una a dos colonias aisladas y de forma homogénea estriar la placa de agar sangre con siembra masiva.
- Con una pinza, colocar un disco de sulfatrimetropin sobre la siembra realizada.
- Aplicar una suave presión al disco para que éste se adhiera (teniendo cuidado de no hundir en el medio).
- Incubar a 35 a 37°C con 5 – 7% de CO₂ durante 18 a 24 hrs.

Lectura:

- Medir en milímetros el diámetro de la zona clara de inhibición.

Interpretación de resultados:

- Reacción positiva: Resistencia.
- Reacción negativa: sensibilidad.

q) Prueba de PYR (L-pyrrolidonil alfa-naftalamida)

Principio:

Liberación de alfa-naftalamida + cinamaldehido.


Mide la actividad de la enzima pyrrolidonil arilamidasa que hidroliza el PYR.

Materiales:

- Discos de PYR.
- Cinamaldehido.
- Asa bacteriológica.

Procedimiento:

- Con la ayuda de un asa estéril tomar una a dos colonias aisladas y disolver en un tubo con 50ul de solución fisiológica estéril hasta formar una suspensión densa.
- Con una pinza, colocar un disco dentro del tubo antes preparado.
- Agitar.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 26 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Incubar a 35 a 37°C con 5 – 7% de CO₂ durante 30 min. Si se utiliza para diferenciar estafilococos incubar por 2 horas en aerobiosis.
- Colocar el reactivo de contraste.
- Ver cambio de color.

Interpretación de resultados:

- Reacción positiva = color rojo.
- Reacción Negativa= amarillo.

r) Prueba de la penicilina

Principio:

- Se utiliza en la clasificación presuntiva de *Moraxella Catarrhalis* de otras *Moraxellas s.p.*

Materiales:


- Discos de penicilina de 10 Ug.
- Placa de agar sangre.
- Asa bacteriológica.

Procedimiento:

- Con la ayuda de un asa estéril tomar una a dos colonias aisladas y de forma homogénea estriar la placa de agar sangre con siembra masiva.
- Con una pinza, colocar un disco de penicilina de 10 Ug sobre la siembra realizada.
- Aplicar una suave presión al disco para que éste se adhiera (teniendo cuidado de no hundir en el medio).
- Incubar a 35 a 37°C durante 18 a 24 hrs.
- Realizar tinción de gram levantando las colonias de alrededor del halo de inhibició
- Observar al microscopio con aceite de inmersión y objetivo de 100X.

Interpretación de resultados:

- Reacción positiva: la forma de las bacterias permanecen como diplococos gramnegativos identificando a *Moraxella catarrhalis*.
- Reacción negativa: Si es otro tipo se observan bacterias filiformes.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	27 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

7. PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR CULTIVOS

7.1. Hemocultivo

Principio:

- La indicación más empleada de los hemocultivos es la sospecha de una bacteremia.

Materiales:

- Placas de agar sangre.
- Placas de agar chocolate.
- Asa bacteriológica.
- Frasco de Hemocultivo con muestra en estudio.
- Jeringas de 1 ml.

Muestra:


- Sangre.

Procedimiento:

- El frasco de Hemocultivo recolectado en toma de muestra colocar a la estufa.
- Incubar de 35 a 37 °C por 18 a 24 horas.
- Desinfecte el tapón de caucho del frasco de hemocultivos con alcohol yodado.
- Realizar 4 repiques del Hemocultivo: agar chocolate el primero y los demás a agar sangre con siembra por agotamiento (anteriormente explicado).
- Cada Repique se debe realizar por día y el cuarto el penúltimo día.
- Flujograma del proceso ANEXO 1

Interpretación de resultados:

- El resultado del cultivo se informa en el lapso de 7 días.
- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Un cultivo positivo se observa por:
 - Aparición de turbidez.
 - Presencia de coagulo.
 - Formación de espuma.
 - Presencia de gas.
- Proceder a realizar la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes descrita en el punto

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 28 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

7.2. Urocultivo

Principio:

- La indicación más empleada de los urocultivos es la sospecha de una infección urinaria, pielonefritis o glomerulonefritis, etc.

Materiales:

- Placas de agar sangre.
- Placas de agar EMB, CLED o Mac Conkey.
- Asa bacteriológica calibrada.
- Frascos estériles de orina.


Muestra:

- Orina

Procedimiento:

Ordene las muestras de acuerdo a la numeración establecida en la orden médica.

- Sembrar la muestra de orina previa homogeneización, con el asa bacteriológica calibrada (0.1 ml de dilución) de forma reticulada como ya se explico en el punto **5.4.5.** en cajas Petri con agar sangre y EMB.
- Incubar 24hrs. en estufa de 35 a 37 °C.
- Proceder a realizar el estudio químico, físico y sedimento de la orina.
- Enumerar los tubos de acuerdo a las muestras.
- Homogeneizar la muestra de orina por inversión.
- Vaciar a los tubos correspondientes 10 cc de orina.
- Observar aspecto, color y registrar.
- Poner una tira reactiva a cada tubo y realizar la lectura en los tiempos recomendados, comparando colores con el patrón del frasco del fabricante.
- Registrar en las órdenes médicas.
- Centrifugar los tubos 5 minutos a 2000 rpm.
- Enumerar las láminas con marcador de vidrio.
- Desechar el sobrenadante de los tubos por inversión.
- Homogeneizar el sedimento de cada tubo.
- Tomar una gota con la pipeta Pasteur.
- Dispensar 1gota del sedimento al porta objetos.
- Cubrir los preparados con cubreobjetos.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	29 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Llevar al microscopio y observar con el objetivo de 40X para la observación y recuento de células epiteliales, leucocitos, hematíes, bacterias, levaduras y otros.
- Registrar en la orden y en el cuaderno de registro de bacteriología.
- Terminado el procedimiento retirar el preparado de la platina del microscopio y desechar al frasco con solución de hipoclorito.
- A las 24 horas sacar de la estufa y observar si hubo desarrollo bacteriano.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo positivo se cuenta las colonias obtenidas en cada caja Petri.
- Determinar las unidades formadoras de colonias de una muestra por el método de recuento en placa.
- Se infiere que cada colonia se originó de una sola célula, entonces contando el número de colonias se puede calcular la cantidad de células viables de la muestra.
- El tamaño de la población se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\text{ufc/ml} = \text{N} / \text{vol} \times \text{dil}$$

Donde: **ufc**: unidades formadoras de colonias.

N: número promedio de colonias obtenidas para una dilución dada.

vol: volumen de inóculo

dil: dilución.


- Menos de 10.000 UFC/ml no se toman en cuenta en orinas de media micción.
- Proceder a realizar la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.
- Se considera un cultivo contaminado: si existe desarrollo de más de tres tipos de colonias o si el sedimento urinario no correlaciona al cultivo.
- Si se procesan orinas que no sean de media micción, como las de sonda o punción supra púlica, el criterio para un resultado positivo es diferente.

7.3. Coprocultivo

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos intestinales productores de enterocolitis aguda, infección intestinal o gastroenteritis.

Materiales:

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	30 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Placas de agar Salmonella Shigella.
- Placas de agar MacConkey con sorbitol.
- Caldo de tetracionato.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.

Muestra:

- Heces diarreicas.

Procedimiento:

- Ordene las muestras de acuerdo a la numeración establecida en la orden médica.
- Realizar la siembra del microorganismo (contenido en la muestra) con hisopo estéril (explicado en el punto 5.4.6.) en los tres medios de cultivo SS, Mac Conkey con sorbitol y el caldo de tetracionato, previa adición de tres gotas de lugol, el sembrado por agotamiento como se explico en el punto 5.4.7
- Incubar 24 hrs. de 35 a 37°C.
- A las 24 horas realizar el pase del tetracionato a SS, colocando una gota con el hisopo y siembra por agotamiento.
- Incubar 24 hrs. de 35 a 37°C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo, se observa el desarrollo de colonias rosadas debido a que el medio tiene un indicador de lactosa, y estas colonias no son patógenas, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, se evidencia por la presencia de colonias no fermentadoras de lactosa (colonias transparentes) y se procede a realizar la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes..
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.


7.4. Catéteres intravenosos

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores bacteremia.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	31 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:


- Catéteres intravenosos.

Procedimiento:

- Los catéteres intravenosos son cultivados cualitativa o semi-cuantitativamente, la técnica de cultivo consiste en hacer rodar el extremo del catéter sobre la superficie de los medios cultivos sólidos agar sangre, chocolate, EMB, con la ayuda de una pinza y luego dejarlos en el caldo de enriquecimiento.
- La extracción de la muestra que se encuentra dentro del catéter se realiza con la ayuda de una jeringa y se siembra de igual manera en los medios antes mencionados.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- Del Caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, en los medios sembrados directamente se debe observar:
 - Colonización del catéter: presencia de 1 a 14 unidades formadoras de colonias (ufc) en el cultivo semicuantitativo de la punta del catéter, o de menos de 1000 ufc en el cultivo cuantitativo, en ausencia de signos de infección local o general.
 - Infección asociada a catéter: presencia de 15 o más ufc en el cultivo semicuantitativo o más de 1000 ufc en el cultivo cuantitativo de la punta del catéter, que es la responsable de una infección local o general. La infección local puede manifestarse por la presencia de pus en el punto de inserción del catéter en la piel, inflamación cutánea o subcutánea, celulitis, trombosis venosa o tromboflebitis infecciosa. La infección general puede presentar signos menores (fiebre con o sin escalofríos y leucocitos) y mayores (síndrome séptico con o sin shock). Todos estos signos pueden asociarse o no a un hemocultivo positivo. Y a la inversa un hemocultivo positivo puede existir sin que estos signos estén presentes.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	32 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Bacteriemia asociada a catéter: presencia de 15 o más ufc en cultivo semicuantitativo o más de 1000 ufc en cultivo cuantitativo del segmento distal del catéter y aislamiento del mismo microorganismo en los hemocultivos extraídos por venas periféricas.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.
- Si el cultivo es positivo en el caldo de enriquecimiento informar de acuerdo al desarrollo bacteriano, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.

7.5. Cultivo otico

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:


- Secreción otica.

Procedimiento:

- La siembra se realiza en agar sangre por agotamiento explicada anteriormente, se puede utilizar otros medios de cultivo dependiendo del diagnostico y sospecha del médico tratante.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- En caso de haber sembrado en caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 °
- C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	33 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Si el cultivo es positivo se debe observar si corresponde a la flora del canal externo del oído, debido a que el hisopo no es recomendado para la colección de muestra para diagnosticar otitis media, ya que puede contaminarse con la flora externa. Solo en caso de ruptura del tímpano, se puede usar el hisopo para recoger el líquido.
- Si la bacteria encontrada no corresponde a la flora del lugar, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

7.6. Cultivo ocular

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:


- Secreción ocular.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar agar sangre; y dependiendo del patógeno que se desee aislar se puede utilizar, EMB chocolate, y caldo soya tripticasa explicado anteriormente.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- Del Caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo se debe observar si corresponde a la flora del ojo.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	34 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Si la bacteria encontrada no corresponde a la flora del lugar, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

7.7. Cultivo Nasal

Principio:

Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa (opcional).
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:


- Secreción nasal.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar sangre; y dependiendo del patógeno que se desee aislar se puede utilizar chocolate, agar EMB y caldo soya tripticasa explicado anteriormente.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- Del Caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, se debe observar si corresponde a la flora de la nariz.
- Si la bacteria encontrada no corresponde a la flora del lugar, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	35 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- El cultivo nasal no predice el agente etiológico de infecciones en oído medio o el tracto respiratorio inferior.
- No cultive por anaerobios.

7.8. Líquidos corporales: Líquido peritoneal, ascítico, bilis, sinovial, pericardico, pleural y torácico:

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate.
- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:


- Líquidos antes mencionados.

Procedimiento:

- Si el líquido en estudio es límpido proceder a centrifugar en un tubo estéril con tapa por 15 min a 3000 rpm.
- Desechar el sobrenadante.
- Con el sedimento realizar tinción de Gram (explicado en 5.3.) y sembrado.
- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar chocolate, agar sangre, EMB y caldo soya tripticasa explicado anteriormente.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- Del Caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	36 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Si el cultivo es positivo proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

7.9. Secreción de glándula de Bartholino

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate.
- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:


- Secreción de glándula de Bartholino.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar chocolate, agar sangre, EMB y caldo soya tripticasa explicado anteriormente.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- Del Caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 37 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

7.10. Secreción prostática

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección a nivel de la próstata.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate.
- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:


- Muestra de secreción prostática.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar chocolate, agar sangre, EMB y caldo soya tripticasa explicado anteriormente.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- Del Caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 38 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

7.11. Espermocultivo

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección a nivel de la próstata y conductos espermáticos.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate.
- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:


- Muestra de semen.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar chocolate, agar sangre, EMB y caldo soya tripticasa explicado anteriormente.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- Del Caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 39 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

7.12. Secreción Uretral Varones

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección en la uretra.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.

Muestra:


- Secreción uretral.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente con el hisopo, en medios de agar chocolate, agar sangre y EMB explicado anteriormente.
- Con el mismo hisopo realizar el extendido en un portaobjetos y por ultimo colocar en unos 2 ml de solución fisiológica para realizar el examen directo.
- Incubar los medios de cultivo por 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Realizar la observación del examen directo en busca de hongos o algún parasito.
- Observar la tinción de Gram para diferenciar la morfología bacteriana, o la identificación presuntiva de Gonorrea y hongos.
- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	40 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

7.13. Secreción Meato urinaria Varones

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección en la uretra y el pene.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.

Muestra:


- Secreción meato urinaria.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente con el hisopo, en medios de agar chocolate, agar sangre y EMB explicado anteriormente.
- Con el mismo hisopo realizar el extendido en un portaobjetos y por ultimo colocar en unos 2 ml de solución fisiológica para realizar el examen directo.
- Incubar los medios de cultivo por 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Realizar la observación del examen directo en busca de hongos o algún parásito.
- Observar la tinción de Gram para diferenciar la morfología bacteriana, o la identificación presuntiva de Gonorrea y hongos.
- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 41 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

7.14. Secreción Balano prepucial Varones

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección en el pene y el prepucio.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.

Muestra:


- Secreción balano prepucial.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente con el hisopo, en medios de agar chocolate, agar sangre y EMB explicado anteriormente.
- Con el mismo hisopo realizar el extendido en un portaobjetos y por ultimo colocar en unos 2 ml de solución fisiológica para realizar el examen directo.
- Incubar los medios de cultivo por 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Realizar la observación del examen directo en busca de hongos o algún parásito.
- Observar la tinción de Gram para diferenciar la morfología bacteriana, o la identificación presuntiva de Gonorrea y hongos.
- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	42 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

7.15. Secreción Vaginal

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección en la vagina.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.

Muestra:


- Secreción de la vagina.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente con el hisopo, en medios de agar chocolate, agar sangre y EMB explicado anteriormente.
- Con el mismo hisopo realizar el extendido en un portaobjetos y por ultimo colocar en unos 2 ml de solución fisiológica para realizar el examen directo.
- Incubar los medios de cultivo por 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Realizar la observación del examen directo en busca de hongos o algún parasito.
- Observar la tinción de Gram para diferenciar la morfología bacteriana, o la identificación presuntiva de Gonorrea y hongos.
- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	43 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

7.16. Cultivo de Secreción Faríngea

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección en la garganta, amígdalas y faringe.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.

Muestra:

- Secreción faríngea o hisopado de fauces.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar chocolate o agar sangre.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.


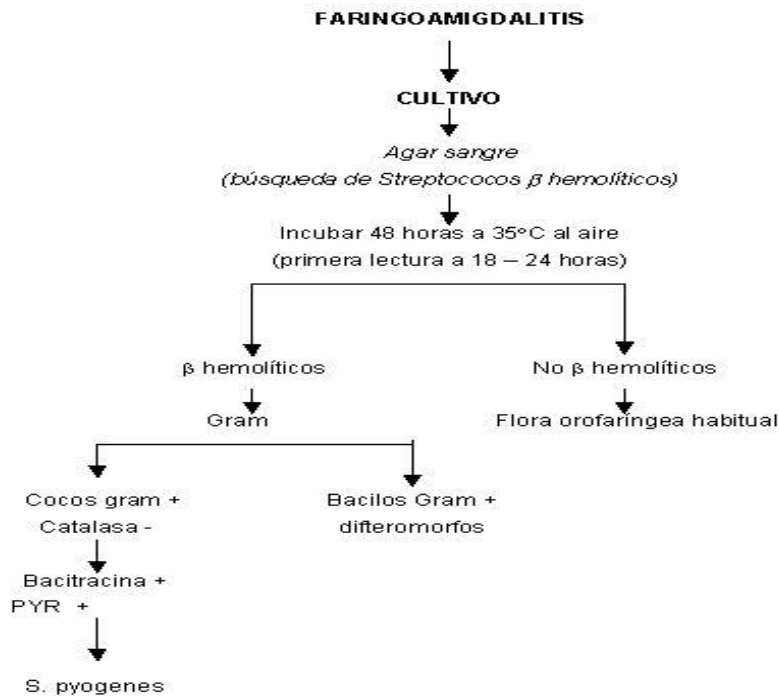
	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No: 44 DE 53
	UNIDAD DE LABORATORIO	
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Figura 1: Algoritmo del Procesamiento del Exudado Faríngeo



Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo se debe observar si corresponde a la flora de la garganta.
- Si las bacterias encontradas no corresponden a la flora del lugar, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.


7.17. Cultivo de espectoración o esputo

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección en las vías respiratorias superiores.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar Chocolate (opcional).

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	45 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.

Muestra:

- Esputo.

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar chocolate o agar sangre.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo, se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo, se debe observar si corresponde a la flora de la garganta.
- Si las bacterias encontradas no corresponden a la flora del lugar, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

7.18. Aspirado traqueal o bronquial

Principio:


- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección en las vías respiratorias inferiores.

Materiales:

- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar Chocolate (opcional).
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.

Muestra:

- Broncoaspirado.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	46 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Procedimiento:

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar chocolate o agar sangre.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo se debe observar si corresponde a la flora de la garganta.
- Si las bacterias encontradas no corresponden a la flora del lugar, proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

7.19. Cultivo de Líquido Cefalorraquídeo

Principio:

- Se usa de preferencia en la búsqueda de patógenos productores de infección por bacterias que producen meningitis.

Materiales:


- Placas de agar Sangre.
- Placas de agar EMB.
- Placas de agar Chocolate.
- Caldo de enriquecimiento soya tripticasa.
- Asa bacteriológica.
- Hisopos estériles.
- Pinzas.

Muestra:

- Líquido cefalorraquídeo.

Procedimiento:

- Si el líquido en estudio es límpido proceder a centrifugar en un tubo estéril con tapa por 15 min a 3000 rpm.
- Desechar el sobrenadante.
- Con el sedimento realizar tinción de Gram (explicado en 5.3.) y sembrado.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	47 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- La siembra se realiza por agotamiento inoculando directamente en medios de agar chocolate, agar sangre, EMB y caldo soya tripticasa explicado anteriormente.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.
- Del Caldo de enriquecimiento realizar el pase a agar sangre y EMB, realizando la siembra por agotamiento.
- Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C.

Interpretación de resultados:

- Si el cultivo es negativo se despacha para su reporte con la fecha de entrega y el número de registro marcado con fosforescente.
- Si el cultivo es positivo proceder a la identificación bacteriana con las pruebas bioquímicas correspondientes.
- Una vez identificada la bacteria, realizar el antibiograma.

7.20. Baciloscopia de esputo

Principio:

- Para el diagnóstico de la tuberculosis se debe recolectar 3 muestras de esputo en días consecutivos y realizar baciloscopia seriada del mismo.

Materiales:


- Set de tinción de Ziehl – Neelsen.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Soporte para teñir.
- Microscopio.
- Aceite de inmersión.
- Portaobjetos.

Muestra:

- Esputo por tres.

Procedimiento:

- Se procede a realizar el extendido de la muestra en la superficie del porta objetos bajo las siguientes características:
 - Extender con palito de madera para evitar aerosoles.
 - La superficie de extensión no debe ser mayor a 3 cm de largo por 2 cm de ancho.
 - No debe llegar a los extremos.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	48 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

- No debe ser muy gruesa.
- Debe ser uniforme para evitar la precipitación del colorante.
- El tiempo de tinción con cada colorante varía según el reactivo utilizado y la marca (ver prospecto adjunto) y técnica de Tinción de Ziehl – Neelsen.
- Observar con el objetivo de inmersión por un lapso mínimo de 15 minutos por placa.

Interpretación de resultados:

- Los bacilos de la Tuberculosis se distinguen debido a que son los únicos que se tiñen de rosado debido al colorante, de ahí su nombre.
- No se observan BAAR: Cuando no se observa ningún bacilo ácido alcohol resistente.
- Positivo 1- 9 BAAR: Si se observan de 1 a 9 bacilos en toda la placa.
- Positivo +: Si se observa 1 bacilos por campo microscópico.
- Positivo ++: Si se observan de 1 a 9 bacilos por campo microscópico.
- Positivo +++: Si se observan más de 10 bacilos por campo microscópico.

7.21. Examen Micológico Directo

Principio:


- Se utiliza para diagnóstico presuntivo de micosis por visualización de esporas e hifas de hongos.

Materiales:

- Solución de hidróxido de potasio o solución fisiológica.
- Set de tinción con azul de metileno.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Soporte para teñir.
- Microscopio.

Procedimiento:

- En el caso del raspado de la lesión, colocar toda la muestra de la caja petri a solución de hidróxido de potasio o fisiológica; centrifugar y observar al microscopio colocando en un portaobjetos y cubriendo con cubreobjetos con el objetivo de 40X.
- La cinta adhesiva en el portaobjetos debe ser teñida con azul de metileno, colocando por los extremos de la cinta o colocar una gota de este colorante antes de pegar el mismo, el tiempo de tinción puede variar de 3 a 5 minutos. Observar con el objetivo de 40X.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	49 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Interpretación de resultados:

- Esta técnica puede servir para observar esporas e hifas de hongos como:
 - Pitiridiasis versicolor,
 - diferentes especies de Cándida,
 - y otros hongos que generalmente corresponde al orden de los dermatofitos.

7.22. Citología de moco nasal o búsqueda de eosinofilos en moco nasal

Principio

- Se utiliza para diagnostico de rinitis alérgica.

Materiales:

- Set de tinción de hematología Panoptico u otra.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Soporte para teñir.
- Microscopio.

Procedimiento:

- La muestra obtenida por raspado o cepillado de las fosas nasales, teñir por el método de tinción en hematología (ver técnica en el set de tinción).
- Observar al microscopio, con aceite de inmersión y el objetivo de 100X.

Interpretación de resultados:


- Esta técnica puede servir para observar eosinofilos, leucocitos polimorfonucleares y mononucleares.
- Se informa la cantidad de eosinofilos en porcentaje por cada 100 elementos de la serie blanca observados.
- En caso de no existir eosinofilos se debe anotar.

8. PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR ANTIBIOGRAMA

SENSIBILIDAD IN VITRO A ANTIBIOTICOS

Principio:

Conjunto de procedimientos que permiten determinar la sensibilidad in vitro de un microorganismo ante un determinado ATB.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	50 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Las pruebas de sensibilidad o susceptibilidad antimicrobianas se utilizan para determinar la actividad de un ATB frente a una cepa en particular.

8.1. Técnica de difusión de discos en agar Muller Hinton (Bauer – Kirby)

Principio:

- La prueba de difusión en agar o método de Bauer Kirby se basa en la formación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de un disco de papel filtro impregnado con el antimicrobiano a probar.

Material:


- Hisopos estériles.
- Pinzas estériles o dispensador.
- Agar Muller Hinton con 4 mm de altura.
- Solución salina al 0.9%.
- Tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland.
- Sensidiscos.

Procedimiento:

- Seleccionar de 5 a 10 colonias aisladas de un cultivo puro de 18 a 24 horas de incubación y transferirlas a un tubo que contenga 3 ml de solución salina estéril al 0.9%.
- Ajustar la suspensión a una turbidez equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland (1.5×10^8 UFC/ml).
- Inmediatamente después, introducir el hisopo estéril en el tubo, rotarlo y presionarlo contra las paredes.
- Inocular en la superficie seca de las cajas de Agar Muller Hinton, estriando la superficie en tres direcciones (ángulos de 45°).
- Colocar los discos con los antimicrobianos a probar, presionando suavemente, en la superficie inoculada con pinzas o dispensador.
- Incubar a 35°C durante 24 hrs.
- Para el uso apropiado de los discos de antibiograma se cuenta con los manuales de susceptibilidad y resistencia a los antimicrobianos, del Laboratorio de Referencia de Bacteriología Clínica de INLASA.(disponibles en la sección de Bacteriología).

Lectura:

- Medir los diámetros de los halos de completa inhibición de crecimiento.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	51 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

Interpretación de resultados:

- Interpretar las lecturas según la tabla de la CLSI (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests).
- El Punto de corte de los halos, corresponde a un valor de CIM equivalente a la concentración de ATB que se alcanza en suero. Finalmente se compara la lectura realizada con tablas internacionales y se determina la sensibilidad o resistencia del microorganismo, clasificando a la cepa como Sensible (S) o Resistente y/o Intermedia (R) para ese ATB.

9. REGISTRO DE RESULTADOS

El resultado de los cultivos se informan en el lapso de 48 a 72 horas para la mayoría de los cultivos, excepto secreciones faríngeas que tardan 5 días debido a que es uno de los lugares con mayor cantidad de flora normal y se deben aislar las bacterias que son posibles patógenas, hacer sus pruebas de identificación bacteriana y de resultar positivas proceder al antibiograma, también se debe tomar en cuenta que muchas veces desarrolla Cándida y los hongos son de crecimiento tardío.

Para el caso de los Hemocultivos el resultado sale en el lapso de 7 días debido a los 4 pases que se realiza.


Si el cultivo es negativo el resultado se despacha para su reporte de 24 a 48 horas.

Todos los cultivos terminados se informan encerrando el número de registro del cuaderno de Bacteriología y marcado con fosforescente, con la fecha de entrega.

9.1. Falta de desarrollo en el cultivo

La falta de desarrollo de un cultivo puede deberse a:


- b) Diagnóstico incorrecto.** La inspección es debida a microorganismos no cultivables en los medios habituales, como virus, rickettsias, mycoplasmas y chlamydias.
- c) Interpretación errada de la tinción de Gram.** Se interpreta como microorganismos la presencia de artefactos en la preparación.
- d) Muestra inadecuada.** La muestra clínica no es representativa del material propio del sitio de la infección.
- e) Transporte inadecuado o prolongado.** Si esto sucede, algunos microorganismos pueden no ser viables al momento de llegar al laboratorio. Esto ocurre con anaerobios, estreptococos, Neisseria. Si el transporte es prolongado, puede haber sobre crecimiento de flora residente que oculte la presencia de patógenos, lo que pueden haber estado en menor número.
- f) Terapia con antibióticos.** Aunque sea una dosis única, ésta muchas veces es suficiente para inhibir o retardar el crecimiento bacteriano.
- g) Metodología de cultivo inadecuada.** Se requiere de técnicas especiales para el cultivo de determinados patógenos, como el caso de anaerobios, micobacterias, hongos y ciertas

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	52 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

bacterias exigentes en cuanto a sus nutrientes y/o condiciones de vida. Por esto, el laboratorio debe conocer cuál es la sospecha diagnóstica, para tener la oportunidad de cultivar al agente etiológico.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. Introducción a la Microbiología. Editorial Acirbia SA, Zaragoza España, 2003.
2. Vullo D.L., Wachsman M.B., Alché L.E. Microbiología en Práctica. Editorial Atlante S.R.L. Buenos Aires, 2006.
3. Mac Faddin, J. F., Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 2007.
4. Finegold S., Baron EJ, Bailey – Scott: Diagnóstico Microbiológico, Edit. Médica Panamericana, 7ª edición, Bs As – Argentina, Págs. 140 – 141.
5. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud – Inlasa, Manual Técnico: Laboratorio de Nivel I, La Paz – Bolivia. 2005
6. INSTITUTO NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD, Manual para la Vigilancia de Laboratorio del *Haemophilus influenzae* y del *Streptococcus pneumoniae*, La Paz – Bolivia, Pag. 15.
7. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, Taller sobre la Identificación Bioquímica y Serológica de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*: Manual de *Streptococcus pneumoniae*, Santa Fe de Bogotá – Colombia, Págs. 11, 15, 16, 19, 25, 30, 33, 34, 38.
8. INSTITUTO ADOLFO LUTZ, Manual de Bacteriología de *Neisseria meningitidis*, San Pablo - Brasil, Págs. 26 - 28.
9. Mc FADDIN J., Pruebas bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica; Ed. Panamericana, México D.F., 2000, Pags. 149 – 153.
10. NCCLS, Disck Difusión – Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. Supplemental Tables.
11. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD – ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana, Washington – EUA, Págs. 12, 13, 76, 87.
12. Trigo Ch. y colaboradores, BACTERIOLOGIA BASICA, Edit. Huellas, 1ª Edición, La Paz – Bolivia, Págs. 119 – 135.
13. URMENETA B.A. et.al, Manual Práctico de Microbiología, Ed. Masson S.A, Barcelona – España, 2005.
14. Koneman Ew, Allen SD, Janda WM, et al. ColorAtlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4a ed., Lippincott Company. 2002.
15. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. Am J Clin Pathol 2005; 45:493-496.
16. Hessen Mt, Kaye D. Principles of Selection and Use of Antibacterial Agents. Infect Dis Clin North Am 2003; 3: 479-489.
17. Montiel F, Kaltwasser G. El Diagnóstico Microbiológico, Su Futuro . Rev Ch Infecto 2000; 7:137-143.

 <p>SEGURO SOCIAL UNIVERSITARIO COCHABAMBA - BOLIVIA</p>	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	UNIDAD DE LABORATORIO	53 DE 53
	DESCRIPCIÓN DEL MANUAL BACTERIOLOGIA	CODIGO

18. Kaltwasser , García S, Salinas A, et al. Use of Enzymatic Amplification in the Diagnostic of Extrapulmonary Mycobacterium tuberculosis. Comunicación XXXII ICAAC. (Octubre 1992, Anaheim, California, USA.
19. Seeley, H.W.Jr.; Vandermark, P.J. , Lee, J.J., "Microbes in action. A laboratory manual of microbiology". Editores W. H. Freeman and Company, Cuarta Edición, Capítulo 5, 2001.