

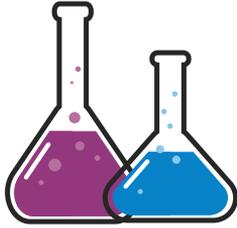
# **Tomas de muestras básicas para el módulo de Bacteriología y Micología Médicas: un enfoque ilustrado**

---

**Dr. Roberto Cruz González Meléndez**  
Coordinador



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



# **Tomas de muestras básicas para el módulo de Bacteriología y Micología Médicas: un enfoque ilustrado**

---

**Dr. Roberto Cruz González Meléndez**  
Autor y Coordinador General

**Q.F.B Manuel Orduña Sánchez**  
**Q.F.B. Georgina Guadalupe Bermejo Torres**  
**Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz**  
**Q.F.B. Ana Laura Loreto Pérez**  
**Q.F.B. Angélica Ramón Olivera**  
**Q.F.B. Antonio Avilés Villada**  
**Q.F.B. Stefhany Liliana Ortega Cortés**  
Autores

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza



Dr. Vicente Jesús Hernández Abad  
**Director**

Dra. Mirna García Méndez  
**Secretaria General**

Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara  
**Secretario de Desarrollo Académico**

CD. Yolanda Lucina Gómez Gutiérrez  
**Secretaria de Desarrollo Estudiantil**

Mtro. Luis Alberto Huerta López  
**Secretario Administrativo**

Dra. María Susana González Velázquez  
**Jefa de la División de Planeación  
Institucional**

Dra. Rosalva Rangel Corona  
**Jefa de la División de Vinculación**

Dr. David Nahum Espinosa Organista  
**Jefe de la División de Estudios de  
Posgrado e Investigación**

Lic. Carlos Raziel Leños Castillo  
**Jefe del Departamento de Diseño  
Editorial y Comunicación Gráfica**

**Datos para catalogación bibliográfica**

Autores: Roberto Cruz González Meléndez, Manuel Orduña Sánchez, Georgina Guadalupe Bermejo Torres, Rosalba Cervantes Cruz, Ana Laura Loreto Pérez, Angélica Ramon Olivera, Antonio Avilés Villada, Stefhany Liliana Ortega Cortés.

**Tomas de muestras básicas para el módulo de Bacteriología y Micología Médicas: un enfoque ilustrado.**

UNAM, FES Zaragoza, agosto de 2022.

Peso: 10.4 MB.

ISBN: 978-607-30-6316-6.

Diseño de portada: Carlos Raziel Leños Castillo.  
Formación de interiores: Claudia Ahumada Ballesteros.

Esta obra fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales Para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) Proyecto PE 209012.

---

**DERECHOS RESERVADOS**

Queda prohibida la reproducción o transmisión total o parcial del texto o las ilustraciones de la presente obra bajo cualesquiera formas, electrónicas o mecánicas, incluyendo fotocopiado, almacenamiento en algún sistema de recuperación de información, dispositivo de memoria digital o grabado sin el consentimiento previo y por escrito del editor.

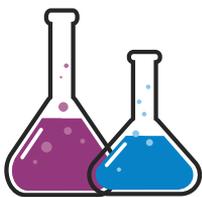
**Tomas de muestras básicas para el módulo de Bacteriología y Micología Médicas: un enfoque ilustrado.**

**D.R. © Universidad Nacional Autónoma de México**

Av. Universidad # 3000, Col. Universidad Nacional Autónoma de México, C.U.,  
Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

Av. Guelatao # 66, Col. Ejército de Oriente,  
Alcaldía Iztapalapa, C.P. 09230, Ciudad de México, México.

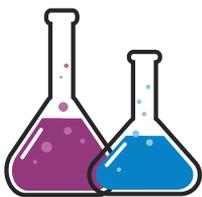


# Índice

Introducción	5
Prólogo	9
Autores por práctica	11
Objetivos del manual	13
Propósito del manual	15
Aspectos básicos de bioseguridad	17
Aspectos básicos del control de calidad interno en microbiología	27
Reglamento del laboratorio	43
Dinámica y criterios de evaluación del trabajo en el laboratorio	45
<b>UNIDAD: Piel y músculo esquelético</b>	
<b>Práctica 1</b> Aislamiento de hongos de uñas causantes de micosis	47
<b>UNIDAD: Aparato Gastrointestinal</b>	
<b>Práctica 2</b> Diagnóstico de infecciones bacterianas del aparato gastrointestinal mediante el coprocultivo	75
<b>UNIDAD: Aparato respiratorio</b>	
<b>Práctica 3</b> Diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio superior mediante el exudado ótico	115
<b>Práctica 4</b> Diagnóstico de infecciones del tracto respiratorio superior mediante el exudado faríngeo	153



<b>Práctica 5</b> Diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio superior mediante el exudado nasofaríngeo	<b>187</b>
<b>UNIDAD:</b> Aparato circulatorio	
<b>Práctica 6</b> Diagnóstico de infecciones bacterianas del aparato circulatorio mediante el hemocultivo	<b>219</b>
<b>UNIDAD:</b> Aparato genitourinario	
<b>Práctica 7</b> Diagnóstico de infecciones de vías urinarias mediante el urocultivo	<b>269</b>
<b>Práctica 8</b> Diagnóstico de infecciones del tracto genital femenino mediante el exudado vaginal	<b>315</b>
<b>Práctica 9</b> Diagnóstico de infecciones del tracto genital masculino mediante el exudado uretral	<b>357</b>
<b>Anexo I.</b> Formato de resultados método tradicional	<b>402</b>
<b>Anexo II.</b> Formato de resultados método alternativo	<b>405</b>
<b>Anexo III.</b> Sensibilidad a antibióticos	<b>413</b>
<b>Anexo IV.</b> Formato de informe de laboratorio	<b>417</b>
<b>Anexo V.</b> Principio del método alternativo: api 20 y medios cromogénicos	<b>418</b>
<b>Anexo VI.</b> Reporte de uroanálisis	<b>420</b>
<b>Anexo VII.</b> Determinación de <i>Candida albicans</i>	<b>421</b>
<b>Anexo VIII.</b> Elección del espéculo y su manejo	<b>422</b>
<b>Anexo IX.</b> Cuestionario de evaluación de prácticas	<b>426</b>
<b>Anexo X.</b> Rúbrica	<b>427</b>
<b>Anexo XI.</b> Lista de cotejo	<b>429</b>



# Introducción

---

**E**l módulo de Bacteriología y Micología Médicas se encuentra ubicado en el 9° semestre de la orientación de bioquímica clínica de la carrera de Q.F.B.

Este módulo cuenta con un manual de prácticas que fue elaborado con el enfoque de taxonomía bacteriana, cuando en la actualidad la orientación se enfoca por órganos y sistemas del cuerpo humano. El presente libro tiene un enfoque por anatomía humana en donde se consideran las tomas de muestra básicas de acuerdo con el programa del módulo de Bacteriología y Micología Médicas. Se incorporan los medios cromogénicos y pruebas API 20, con la finalidad de dar a conocer a los alumnos algunos de los avances científicos y tecnológicos en microbiología, logrando con ello preparar mejor a los alumnos que cursan este módulo y proporcionar los conocimientos necesarios para su formación y desarrollo de su futura profesión.

Por lo anterior, debe mencionarse que el manual de prácticas del módulo de Bacteriología y Micología Médicas hasta el momento, ha cumplido su cometido de proporcionar al alumno habilidades y destrezas para efectuar una correcta identificación microbiana; sin embargo, se pretende incluir en este nuevo documento prácticas que consideren la identificación de bacterias y hongos de interés en nuestro país, así como el uso de nuevas técnicas diagnósticas, y se incorporen temas como la bioseguridad, control de calidad y el manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos, lo que permitirá aplicar e integrar los conocimientos aprendidos en el módulo de Bacteriología y Micología Médicas con la finalidad de preparar mejor a los alumnos para que sirvan a la comunidad responsablemente.

Considerando el enfoque actual por órganos y sistemas las prácticas contenidas en este libro son:



### Piel y músculo esquelético

- Aislamiento de hongos de uñas causantes de micosis.

### Aparato gastrointestinal

- Diagnóstico de infecciones bacterianas del aparato gastrointestinal mediante coprocultivo.

### Aparato respiratorio

- Diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio superior mediante el exudado ótico.
- Diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio superior mediante el exudado faríngeo.
- Ex Diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio superior mediante el exudado nasofaríngeo.

### Aparato circulatorio

- Diagnóstico de infecciones bacterianas del aparato circulatorio mediante el hemocultivo.

### Aparato genitourinario

- Diagnóstico de infección de vías urinarias mediante el urocultivo.
- Diagnóstico de infecciones del tracto genital mediante el exudado vaginal.
- Diagnóstico de infecciones del tracto genital mediante el exudado uretral.

Para la realización de las prácticas antes mencionadas se tomó en consideración las etapas del control de calidad lo cual es importante para obtener resultados confiables y reproducibles, por ello las prácticas están divididas en tres etapas: preanalítica, analítica y postanalítica para el proceso de diagnóstico microbiológico con lo que se pretende mejorar el proceso de enseñanza y aprendizaje.



Con base en lo anterior se consideraron dos capítulos muy importantes en el área de la Microbiología y en el Laboratorio Clínico como son: Aspectos básicos sobre bioseguridad y aspectos básicos del control de calidad interno en Microbiología. Así mismo, se incorporó el Reglamento que regirá la estancias de los alumnos durante sus actividades prácticas en el laboratorio.

Un aspecto a destacar es que en este libro se consideró el uso de simuladores anatómicos los cuales son de gran ayuda para poder mostrar al alumno de forma demostrativa la manera de realizar una técnica correcta en prácticas como urocultivo, exudado vaginal y exudado uretral, donde se tienen inconvenientes para realizarla en pacientes, de modo que cuando el alumno se enfrente al campo laboral pueda desempeñar las habilidades prácticas en este tipo de tomas de muestras.

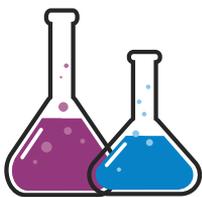
Las prácticas que se diseñaron son innovadoras ya que cuentan con el uso de medios cromogénicos y sistemas miniaturizados API 20, lo cual no se utilizaba en prácticas anteriores de dicho módulo, estos medios y sistemas proveen al alumno de conocimientos sobre avances tecnológicos que se llevan a cabo en la actualidad en el diagnóstico microbiológico. Un aspecto relevante incluido en este libro es el de bioseguridad ya que al estar en un laboratorio de enseñanza básica e investigación como el Laboratorio del módulo de Bacteriología y Micología Médicas, se deben tomar en cuenta medidas para la protección tanto de los profesores, alumnos, así como de los pacientes que acudan a realizarse los estudios que soliciten. Este punto también incluye el manejo adecuado y disposición final de residuos peligrosos biológicos infecciosos.

El diseño de estas prácticas es novedoso ya que cuenta con imágenes que muestran de manera gráfica, sencilla y paso a paso, el procedimiento que se debe seguir, así como el material, el equipo y reactivos que se utilizarán de modo que para el alumno sea más claro, entendible y fácil de realizar en el momento que requiera de ello, para tener una técnica correcta y un acertado diagnóstico microbiológico. Con base en lo anterior el alumno tiene dos procedimientos alternativos: el primero cuando se cuenta con una muestra de fluido biológico, y la segunda puede hacerlo trabajando con una cepa pura, en donde tendrá la posibilidad de utilizar el método tradicional o el método alternativo. Lo anterior dependerá de la existencia de materiales, reactivos, medios de cultivo tradicionales y cromogénicos, pruebas bioquímicas y pruebas API 20.



Con la finalidad de llevar a cabo la evaluación de los procesos de enseñanza y aprendizaje de las prácticas de laboratorio, se incorporó la “dinámica y criterios de evaluación del trabajo en el laboratorio”, así como, la rúbrica y la lista de cotejo para llevar a cabo evaluaciones objetivas del desempeño de los alumnos en el laboratorio.

Cabe destacar que se realizó un proceso de validación de las prácticas incluidas en este material, para ello se les proporcionó a los alumnos de 9° semestre y a los profesores que imparten el módulo de Bacteriología y Micología Médicas cada una de las prácticas para que previo a la realización de esta, la leyeran y conocieran el procedimiento a realizar, posteriormente se les aplicó un cuestionario. Con lo cual el diseño de las prácticas tiene una aceptación de bueno a excelente por parte de alumnos y profesores considerando la validación de estas.



# Prólogo

**E**ste documento representa el trabajo y compromiso de un grupo de profesores y alumnos entusiastas que tienen como visión el mejorar el proceso de enseñanza y aprendizaje en el módulo de Bacteriología y Micología Médicas de la Carrera de Q.F.B. tanto en los componentes teórico como práctico.

Este libro es el producto que representa la culminación del esfuerzo en la modificación y actualización de los contenidos académicos del módulo de Bacteriología y Micología Médicas, desde la revisión del programa sintético y analítico de este módulo hasta la generación de las tablas de especificaciones para la elaboración de evaluación de exámenes o pruebas mejor diseñadas.

Este libro contiene el diseño de nuevas prácticas realizadas con base en órganos y sistemas de cuerpo humano, así se cuenta con una práctica para piel y musculo esquelético, una para aparato gastrointestinal, tres para aparato respiratorio, una para el sistema circulatorio y tres prácticas para el sistema genitourinario.

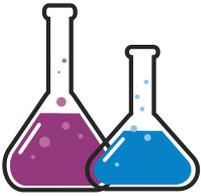
Las prácticas tienen un diseño innovador que permite guiar al estudiante paso a paso en las etapas de control de calidad para lograr un diagnóstico microbiológico confiable. Cada una de las prácticas contiene además la inclusión de imágenes que ilustran paso a paso cada uno de los procedimientos que se sigue en cada una de ellas para cuando se tienen muestras biológicas como con cepas puras, medidas de bioseguridad, el uso de medios cromogénicos y sistema miniaturizadas de identificación como son las pruebas API 20, y el uso de simuladores anatómicos para las prácticas de exudado vaginal y exudado uretral.

Lo anterior permitirá fortalecer los procesos de enseñanza y aprendizaje en el módulo de Bacteriología y Micología Médicas, y ser punta de lanza para otros módulos que sigan este modelo y que ha generado productos muy importantes para cada vez preparar mejor a los alumnos.



Agradezco la confianza de todos los profesores y alumnos, por permitirme coordinar todas las actividades académicas que han derivado en todos los productos antes mencionados, así como al financiamiento otorgado por el Proyecto PAPIIME PE 209012 de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA).

***Dr. Roberto Cruz González Meléndez***  
Autor y Coordinador del Manual



# Autores por práctica

---

 **PRÁCTICA 1.** Aislamiento de infecciones de uñas causantes de micosis.

Q.F.B. Ana Laura Loreto Pérez

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

 **PRÁCTICA 2.** Diagnóstico de infecciones bacterianas del aparato gastrointestinal mediante el coprocultivo.

Q.F.B. Ana Laura Loreto Pérez

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez

 **PRÁCTICA 3.** Diagnóstico de infecciones de aparato respiratorio superior mediante el exudado ótico.

Q. F. B. Angélica Ramón Olivera

Q. F. B. Sthefany Liliana Ortega Cortés

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

 **PRÁCTICA 4.** Diagnóstico de infecciones de aparato respiratorio superior mediante el exudado nasofaríngeo.

Q. F. B. Angélica Ramón Olivera

Q. F. B. Sthefany Liliana Ortega Cortés

Dr. Roberto Cruz González Meléndez



 **PRÁCTICA 5.** Diagnóstico de infecciones de aparato respiratorio superior mediante el exudado nasofaríngeo.

Q. F. B. Angélica Ramón Olivera

Q. F. B. Sthefany Liliana Ortega Cortés

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

 **PRÁCTICA 6.** Diagnóstico de infecciones bacterianas del aparato circulatorio mediante el hemocultivo.

Q.F.B. Ana Laura Loreto Pérez

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez

 **PRÁCTICA 7.** Diagnóstico de infecciones de vías urinarios mediante el urocultivo.

Q.F.B. Antonio Avilés Villada

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

 **PRÁCTICA 8.** Diagnóstico de infecciones del tracto genital mediante el exudado vaginal.

Q.F.B. Antonio Avilés Villada

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

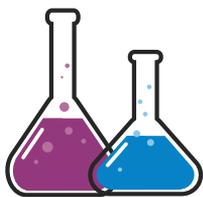
Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz

 **PRÁCTICA 9.** Diagnóstico de infecciones del tracto genital mediante el exudado uretral.

Q.F.B. Antonio Avilés Villada

Q.F.B. Georgina Bermejo Torres

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

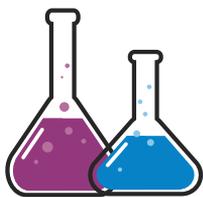


## Objetivos del manual

---

- Mejorar el proceso de enseñanza, aprendizaje y la preparación académica de los alumnos de 9° semestre que cursan este módulo con el diseño de estas prácticas.
- Proporcionar a los alumnos por medio de este manual electrónico una fuente de información para que previo a la realización de la práctica tenga los elementos y conocimientos necesarios para poder realizar la identificación y diagnóstico microbiológico.
- Emplear métodos tradicionales y métodos alternativos de diagnóstico para la identificación de microorganismos causantes de diversas patologías en los aparatos y sistemas del cuerpo humano del módulo de Bacteriología y Micología Médicas de la carrera de Q.F.B. en la FES Zaragoza.
- Desarrollar un formato entendible y didáctico, que describan detalladamente en forma sencilla y completa los métodos a utilizar, explicando pasó a pasó con imágenes representativas las etapas de control de calidad: preanalítica, analítica y postanalítica.
- Proporcionar la información sobre bioseguridad, etapas de control de calidad y manejo de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos en la realización de cada una de las prácticas incluidas en este libro.



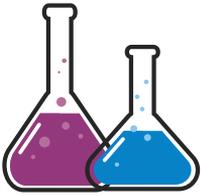


## Propósito del manual

---

**P**roporcionar a los alumnos de 9° semestre de la carrera de Q.F.B. de la orientación de bioquímica clínica un manual que muestre la forma adecuada para realizar la identificación y diagnóstico de microorganismos causantes de diversas patologías por órganos y sistemas del cuerpo humano contempladas en el módulo de Bacteriología y Micología Médicas, por medio de un diseño novedoso en el cual, a través de imágenes que muestran de manera gráfica y paso a paso el procedimiento de cada práctica; de modo que sea claro y entendible para que previo a la realización de estas, el alumno tenga los conocimientos necesarios para efectuar las técnicas, y posteriormente tenga las habilidades y sea capaz de hacer una adecuada toma de muestra, así como un diagnóstico microbiológico adecuado de agentes patógenos que producen infecciones en el ser humano.





# Aspectos básicos de bioseguridad

---

La OMS define a la bioseguridad como “un conjunto de normas y medidas preventivas destinadas a proteger la salud de las personas frente a riesgos biológicos, físicos, químicos y radioactivos, entre otros y la protección del medio ambiente”.<sup>1-2</sup>

Es decir, la bioseguridad entrega un enfoque estratégico que, a través de la implementación de técnicas, principios y prácticas apropiadas, permite prevenir la exposición involuntaria a agentes químicos, físicos, patógenos y toxinas. Por lo tanto, la bioseguridad se debe entender como una doctrina de comportamiento que promueve el manejo responsable durante la manipulación, no sólo de agentes patógenos o infecciosos, sino además de sustancias químicas y residuos peligrosos. Cuando se aplican los conceptos de bioseguridad, se establece un proceso continuo de reconocimiento, evaluación y mitigación de los riesgos relacionados con actividades de carácter investigativo o docente que sea sostenible en el tiempo.<sup>1</sup>

En el módulo de Bacteriología y Micología Médicas, ubicado en el noveno semestre de la orientación Bioquímica Clínica de la carrera de Q.F.B., los alumnos y docentes conllevan un riesgo de exposición a agentes patógenos, químicos y toxinas, derivados de la realización de las diferentes actividades prácticas incluidas en el Manual de prácticas por anatomía humana para dicho módulo.

Con base en lo anterior es importante que el manual antes mencionado incluya una descripción de los aspectos generales de bioseguridad que sean aplicables en el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas.

De acuerdo al manual de Bioseguridad del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México<sup>3</sup>, es importante determinar la evaluación del riesgo microbiológico, la cual se puede realizar empleando la clasificación de los agentes biológicos en grupos de riesgo (GR). Aunque esta clasificación no es exhaustiva, ya que



se tienen que considerar otros factores tales como: la patogenicidad, la dosis infectiva, el resultado potencial de la exposición, la vía natural de la infección, y la vía de entrada derivada de las manipulaciones en el laboratorio (aérea, ingestión, punción, cortadura), la estabilidad del agente en el ambiente, la concentración del agente, el volumen del material concentrado, la actividad prevista en el laboratorio como el tratamiento de muestras en procedimientos que producen y liberan aerosoles (por ejemplo la centrifugación), sensibilidad y resistencia a los antibióticos y la disponibilidad de intervenciones profilácticas o terapéuticas, entre otros.

Una vez identificado el riesgo y su evaluación, será posible asignar un nivel de bioseguridad al trabajo de cada laboratorio, seleccionar el equipo de protección apropiado para el personal de laboratorio (docentes, alumnos, laboratoristas y personal de intendencia) y elaborar protocolos y programas que incorporen los procedimientos para desinfección, descontaminación e intervenciones en casos de contingencia microbiológica.

A continuación, se describirá la clasificación de agentes biológicos por grupo de riesgo, así como, los niveles de bioseguridad para los laboratorios.

## Clasificación de agentes biológicos por grupos de riesgo<sup>2</sup>

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, los agentes biológicos se clasifican en 4 grupos de riesgo, que se basa principalmente en los factores característicos de cada microorganismo. La clasificación es la siguiente:

### ➤ GRUPO DE RIESGO 1 (GR1) (Riesgo individual y poblacional escaso o nulo)

Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales

### ➤ GRUPO DE RIESGO 2 (GR2) (Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo)

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar



una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

► **GRUPO DE RIESGO 3 (GR3) (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo)**

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

► **GRUPO DE RIESGO 4 (GR4) (Riesgo individual y poblacional elevado)**

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces

## Niveles de bioseguridad (BLS) para los laboratorios y biocontención<sup>4</sup>

Los niveles de bioseguridad se basan en la combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos o potencialmente patógenos de los distintos grupos de riesgo.

Con base en lo anterior, los laboratorios se clasifican en 4 niveles de bioseguridad (BLS por sus siglas en inglés BioSafety Level), los cuales se mencionan a continuación:

► **Nivel de bioseguridad 1 o BSL-1 o LABORATORIO BÁSICO 1.**

Las prácticas, los equipos de seguridad, el diseño y la construcción de la instalación del Nivel de Bioseguridad 1 son adecuados para laboratorios destinados a la educación o capacitación secundaria o universitaria, y para otros laboratorios en los cuales se trabaja con cepas definidas y caracterizadas de microorganismos viables que no se conocen como generadores sistemáticos de enfermedades en humanos adultos sanos,



son microorganismos de muy bajo potencial patogénico<sup>3</sup>. Como ejemplos de algunos microorganismos, se pueden mencionar a *Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberi*, el virus de la hepatitis canina infecciosa, y los organismos exentos conformes a las NHI Recombinant DNA Guidelines (Normas de ADN Recombinante de NIH) son representativos de los microorganismos que cumplen con estos criterios.

Este nivel representa un nivel básico de contención que se basa en prácticas microbiológicas estándar sin ninguna barrera primaria o secundaria especialmente recomendada, salvo una pileta para lavado de manos.

### ► Nivel de Bioseguridad 2 o BSL-2 o LABORATORIO BÁSICO 2.

Las prácticas, los equipos, el diseño y la construcción de instalaciones del Nivel de Bioseguridad 2 son aplicables a laboratorios educativos, de diagnóstico, clínicos u otros laboratorios donde se trabaja con un amplio espectro de agentes de riesgo moderado que se encuentran presentes en la comunidad y que están asociados con enfermedad humana de variada gravedad. Con buenas técnicas microbiológicas, estos agentes se pueden utilizar en forma segura en actividades realizadas en una mesa de trabajo, siempre que el potencial de que se produzcan salpicaduras o aerosoles sea bajo. Ejemplo de los microorganismos que se pueden manejar en este nivel son: el virus de la Hepatitis B, el HIV, la salmonela, y el *Toxoplasma spp.* El Nivel de Bioseguridad 2 es adecuado cuando se trabaja con sangre derivada de humanos, fluidos corporales, tejidos o líneas de células primarias humanas donde puede desconocerse la presencia de un agente infeccioso.

Se debe contar con barreras secundarias, tales como piletas para lavado de manos e instalaciones de descontaminación de desechos a fin de reducir la contaminación potencial del medio ambiente

### ► Nivel de bioseguridad 3 o BSL-3 o LABORATORIO DE CONTENCIÓN 3.

Las prácticas, equipos de seguridad y el diseño y la construcción de las instalaciones de este Nivel pueden aplicarse a instalaciones clínicas, de producción, investigación, educación o diagnóstico, donde se trabaja con agentes exóticos o indígenas con potencial de transmisión respiratoria, y que pueden provocar una infección grave y potencialmente letal. Se considera en este nivel situaciones cuando se manejan grandes volúmenes o concentraciones de microorganismos del grupo de riesgo 2, por entrañar un mayor riesgo de difusión de aerosoles.<sup>3</sup>



Ejemplos de algunos microorganismos que se pueden manejar en el nivel 3 son: *Mycobacterium tuberculosis*, el virus de la encefalitis de St. Louis, y la *Coxiella burnetii*. Los riesgos primarios del personal que trabaja con estos agentes están asociados a la auto inoculación, ingestión y exposición a aerosoles infecciosos. Al manipular agentes del Nivel de Bioseguridad 3 se pone mayor énfasis en las barreras primarias y secundarias para proteger al personal en áreas contiguas, a la comunidad y al medio ambiente de la exposición a aerosoles potencialmente infecciosos.

Las barreras secundarias para este nivel incluyen el acceso controlado al laboratorio y requisitos de ventilación que minimizan la liberación de aerosoles infecciosos desde el laboratorio.

#### ► **Nivel de Bioseguridad 4 o BSL-4 o LABORATORIO DE CONTENCIÓN MÁXIMA 4.**

Las prácticas, equipos de seguridad, y el diseño y la construcción de instalaciones de este nivel son aplicables al trabajo con agentes peligrosos o tóxicos que representan un alto riesgo individual de enfermedades que ponen en peligro la vida, que pueden transmitirse a través de aerosoles y para las cuales no existen vacunas o terapias disponibles. Algunos ejemplos de microorganismos que se manejan en este nivel son: los virus como Marburg o la fiebre hemorrágica Congo-Crimeana.

Los riesgos principales para el personal que trabaja con agentes del Nivel de Bioseguridad 4 son la exposición respiratoria a aerosoles infecciosos, la exposición de membranas mucosas o piel lastimada a gotitas infecciosas y la auto inoculación.

El aislamiento completo del personal de laboratorio de los materiales infecciosos en aerosol se logra principalmente trabajando en una campa de bioseguridad Clase III o en un traje de cuerpo entero, con provisión de aire y presión positiva. Por lo general, la instalación del Nivel de Bioseguridad 4 es un edificio separado o una zona totalmente aislada con sistemas de gestión de desechos y requisitos de ventilación especializados y complejos para prevenir la liberación de agentes viables al medio ambiente.

El laboratorio de máxima contención BSL-4 debe estar controlado por autoridades sanitarias nacionales.<sup>3</sup>



De acuerdo a la OMS, los microorganismos del grupo de riesgo (GR1) se manejan en instalaciones de un nivel de bioseguridad 1 (BSL-1), que son laboratorio de enseñanza básica e investigación, en donde se emplean técnicas microbiológicas apropiadas, además de no requerir Campana de Seguridad Biológica, realizando el trabajo en mesa de laboratorio al descubierto. <sup>2</sup>

Con base a lo anterior, el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de consideraría como un laboratorio Básico 1 o con un nivel de bioseguridad 1 (BSL-1), en donde se manejan microorganismos del grupo de riesgo 1 (GR1).

A continuación, se mencionan los requerimientos, instalaciones, prácticas microbiológicas estándar, uso de equipo de protección personal y disposición de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI), para un laboratorio básico 1 o BSL-1.

### **Requerimientos <sup>3</sup>**

El laboratorio básico BSL-1 debe estar acondicionado para trabajar con microorganismos de nivel 1, que son aquellos que están bien caracterizados y se sabe que no causan enfermedad en las personas sanas y, por ende, no representan un riesgo para el personal del laboratorio y del medio ambiente. Este laboratorio no necesita un área aislada, no requiere de equipo ni de instalaciones especiales de contención, el trabajo con estos microorganismos se puede realizar en un laboratorio de investigación convencional, siguiendo las prácticas estándares de microbiología.

### **Instalaciones <sup>3</sup>**

El laboratorio debe contar con un lavamanos. El laboratorio debe estar diseñado de tal manera que pueda limpiarse con facilidad. Los pisos de mosaico no son apropiados ya que impedirían la descontaminación después de cualquier derrame o salpicadura. Las mesas de trabajo deben ser impermeables al agua y resistentes a solventes orgánicos, ácidos, álcalis y al calor moderado. Los equipos de laboratorio deben estar espaciados con el fin de facilitar el acceso a las operaciones de limpieza, dicho acceso tampoco deberá estar obstaculizado por materiales o cajas.

Algo importante es que no se requiere de cabina de Bioseguridad.



## Prácticas microbiológicas estándar <sup>4</sup>

1. El acceso al laboratorio es limitado o restringido a criterio del director cuando se están llevando a cabo experimentos o trabajos con cultivos y especímenes.
2. Las personas se lavan las manos luego de manipular materiales viables, luego de quitarse los guantes y antes de retirarse del laboratorio.
3. No está permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo. Las personas que usan lentes de contacto en laboratorios deben también utilizar antiparras o un protector facial. Los alimentos se almacenan fuera del área de trabajo en gabinetes o refrigeradores designados y utilizados con este único fin.
4. Está prohibido pipetear con la boca; se utilizan dispositivos pipeteadores mecánicos.
5. Se debe tratar de reducir al máximo la producción y liberación de aerosoles, evitando: agitaciones y pipeteo bruscos, introducción de asas de cultivo calientes dentro de medios de cultivo, etcétera. Las áreas de trabajo deben ser descontaminadas una vez al día, así como después de cualquier derrame de material biológico.<sup>3</sup>
6. Se instituyen políticas para el manejo seguro de objetos cortantes o punzantes.
7. Todos los procedimientos se llevan a cabo con precaución a fin de minimizar la creación de salpicaduras o aerosoles.
8. Las superficies de trabajo se descontaminan como mínimo una vez por día y luego de todo derrame de material viable.
9. Todos los cultivos, stocks y otros desechos reglamentados se descontaminan antes de ser desechados mediante un método de descontaminación aprobado, como, por ejemplo, mediante autoclave o por inmersión en desinfectantes apropiados <sup>3</sup>. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato son colocados en un recipiente duradero, estanco y cerrado para su transporte desde el laboratorio. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio inmediato se embanan de conformidad con las normas locales, estatales y federales aplicables antes de retirarlos del establecimiento.



10. Se debe colocar una señal de advertencia de riesgo biológico en la entrada del laboratorio cuando se encuentren presentes agentes infecciosos. La señal debe incluir el nombre del agente o agentes en uso y el nombre y número de teléfono del investigador.
11. Se encuentra en vigencia un programa de control de roedores e insectos.

### Equipos de Seguridad (Barreras Primarias) <sup>4</sup>

1. En general, no se requieren dispositivos o equipos de contención o equipamientos especiales, como gabinetes de seguridad biológica para las manipulaciones de agentes asignados al Nivel de Bioseguridad 1.
2. Se recomienda el uso de ambos, delantales o uniformes de laboratorio a fin de evitar que la ropa de calle se pueda contaminar o ensuciar. Está prohibido el uso de prendas de laboratorio en lugares como: oficinas administrativas, salas de reuniones o biblioteca.<sup>3</sup>
3. Se deben usar guantes si existen lastimaduras en las manos o si la piel presenta alguna erupción. Deben existir alternativas disponibles al uso de guantes de látex empolvados.
4. Se debe utilizar protección ocular para los procedimientos en los que se puedan producir salpicaduras de microorganismos u otros materiales peligrosos.

### Instalaciones del Laboratorio (Barreras Secundarias) <sup>4</sup>

1. Los laboratorios deben tener puertas para el control de acceso.
2. Cada laboratorio contiene una pileta para el lavado de manos.
3. El laboratorio ha sido diseñado para que su limpieza sea sencilla. Las alfombras no son adecuadas para los laboratorios.
4. Las superficies de las mesas de trabajo son impermeables al agua y son resistentes al calor moderado y a solventes orgánicos, ácidos, álcalis y productos químicos utilizados para descontaminar la superficie de trabajo y los equipos.
5. Los muebles de laboratorio deben tener la capacidad de soportar cargas y usos previstos. Los espacios entre las mesas de trabajo, gabinetes y equipos deben ser accesibles para su limpieza.



6. Si el laboratorio tiene ventanas que se abren hacia el exterior, están provistas de mosquiteros.

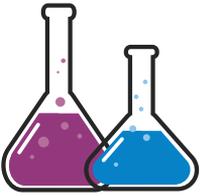
### **Disposición de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI).**

Todo material contaminado que deba salir del laboratorio para su descontaminación (por autoclave o incineración) debe ser colocado dentro de bolsas especiales debidamente cerradas y etiquetadas. Una cinta testigo deberá ser colocada como indicativo de esterilización. Lo anterior de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. <sup>5</sup>

## **Referencias**

1. Facultad de Medicina. Clínica Alemana-Universidad del Desarrollo. Manual de Bioseguridad. [Internet]. Chile: Clínica Alemana- Universidad del desarrollo. 2019 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Manual de Bioseguridad - Facultad de Medicina - Clinica Alemana - Manuales - UNT - StuDocu.
2. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. [internet] Ginebra: Organización Mundial de la Salud. 3ª ed. 2005. [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: BiosafetyCov (who.int)
3. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Manual de Procedimientos de Bioseguridad [internet]. México: UNAM; 2010 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Manual de Bioseguridad 25 Oct 2010 (unam.mx)
4. Centro del Control de Enfermedades (CDC)-National Institute of Health. Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina. [internet] 4a ed. Atlanta: CDC, 2002 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: bioseguridad1.cdr (uib.cat)
5. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 (jalisco.gob.mx)





# Aspectos básicos del control de calidad interno en microbiología

---

**E**l control de calidad se define como el conjunto de técnicas y actividades operacionales para comparar los resultados obtenidos con los requisitos especificados previamente.<sup>1</sup>

El control de calidad se divide en control de calidad externo y control de calidad interno. Aquí se enfocará en este último para el área de Microbiología, como parte importante de este manual, como material didáctico del módulo de Bacteriología Micología Médicas.

El control de calidad interno permite detectar errores aleatorios y sistemáticos mediante la inclusión de muestras de control de calidad en los ensayos realizados en el laboratorio, en el monitoreo de equipos y en los procesos de auditoría.<sup>1</sup>

Sin el control de calidad en los laboratorios clínicos no podrían mantener un grado de eficiencia, reproducibilidad y confianza de los resultados, de tal forma que contribuyan al diagnóstico y tratamiento de las diversas enfermedades que padece el paciente.<sup>2</sup>

Para mejorar la calidad de los laboratorios clínicos en cada una de sus áreas es mediante la implementación de políticas y procedimientos, elaborando el manual de calidad el cual debe incluir los tres aspectos fundamentales en un laboratorio clínico: la fase pre-examen, examen y post examen (fase preanalítica, fase analítica y fase post analítica).<sup>2</sup>

A continuación, se describirán cada una de estas tres fases:



## Fase pre-examen o fase preanalítica

En esta etapa se incluyen el conjunto de actuaciones para la correcta obtención, transporte y conservación de las muestras, así como la elaboración de los criterios de recepción y de aceptación/rechazo de las mismas, garantizando, al mismo tiempo, la máxima información de utilidad clínica para la óptima aceptación de las técnicas de diagnóstico microbiológico a muestras biológicas de origen humano.<sup>3</sup>

En los documentos “recomendaciones para el control de calidad interno en Microbiología Clínica”<sup>3</sup> y “Gestión de la calidad en el Laboratorio Clínico”<sup>4</sup> se describen las etapas de esta fase, las cuales se mencionan a continuación:

### 1. Solicitud de la muestra<sup>2</sup> u hoja de petición<sup>3</sup>

Este documento deberá ser:

- Simple y fácil de cumplimentar.
- Único para cada muestra y estudio/prueba solicitada.
- Permita la identificación inequívoca del paciente, muestra y estudio o prueba solicitada.

Esta solicitud deberá especificar de forma legible todos los datos de identificación del paciente (por ejemplo: número de historia clínica, número de seguridad social, nombre completo y ubicación, servicio solicitante, médico solicitante, tipo de muestra, fecha y hora de obtención de la muestra, diagnóstico, motivo de petición, antibioterapia previa y precisar el estudio o prueba solicitada).<sup>3</sup>

Es importante informar al paciente, ya sea por el personal médico o personal del laboratorio clínico, sobre las condiciones necesarias para realizar la toma de muestra, así como, el suministro de recipientes adecuados, cuando se necesario.

### 2. Cita para la toma de muestras.

- a) Adecuada en día y hora a las necesidades del paciente.
- b) Registro de los datos sin errores administrativos.



- c) Atención personalizada, amable y correcta.
- d) Indicación del lugar y hora de la toma de muestras, así como de las condiciones de preparación previas.
- e) Suministrar recipientes adecuados si fueran necesarios.

### 3. Obtención de las muestras.

En esta etapa es importante considerar el tener todos los materiales listos para su utilización, por ejemplo: hisopos, abatelenguas, gradillas, medios de transporte, contenedores para residuos peligrosos biológico infecciosos, entre otros.

- a) Se deberán realizar las siguientes acciones:
- b) Se comprobará siempre la correspondencia entre la solicitud y la identidad del paciente.
- c) Se verificará si el documento de solicitud contiene todos los datos identificativos.
- d) Se rechazarán aquellas solicitudes que no estén cumplimentadas con todos los datos imprescindibles de identificación del paciente y pruebas solicitadas, y que no puedan ser subsanadas en el momento de la extracción.
- e) Se registrarán los datos de identificación de la persona que realiza la extracción de la muestra, la hora y la fecha de la misma, así como los incidentes que se hayan producido.
- f) Se identificarán los contenedores en el momento de la obtención de la muestra.

### 4. Preparación de las muestras

- a) Preparación del envío:
  - En el punto de extracción se confeccionará un registro diario de recogida y transporte de muestras en el que estén relacionados los contenedores remitidos por cada solicitud.
  - El registro incluirá el nombre de la persona que ha preparado el envío, la hora en que se recoge y quién realiza el transporte.



- Una copia del registro quedará en el centro de extracción y otra acompañará a las muestras (hoja de ruta).
  - Al llegar al laboratorio, la persona que recoge las muestras deberá firmar y hacer constar la hora de recepción.
- b) Existirá un registro de custodia legal, cumpliendo los requisitos necesarios para el transporte de muestras, con implicaciones judiciales, según la normativa legal vigente.

### 5. Transporte de las muestras.

Existirá un sistema unificado de transporte de muestras entre los puntos de extracción y el laboratorio de Microbiología.

a) Toda muestra de origen humano es potencialmente infecciosa y el transporte debe efectuarse de acuerdo a las siguientes normas:

#### ➤ Muestras:

- Transporte en contenedores herméticos que eviten el riesgo de infección al personal que los manipule y su posible contaminación externa.
- Los contenedores deben transportarse verticalmente y cerrados. El sistema de transporte evitará la agitación mecánica.

#### ➤ Neveras/contenedores:

- Dotadas de relleno absorbente.
- Identificación externa de que contienen material de riesgo biológico.
- Contenedor rígido y opaco a la luz.
- Mantenimiento de la temperatura adecuada para cada muestra (neveras termostatzadas). Control de temperatura con termómetro de máxima y mínima.

El transporte debe ser lo más rápido posible. Si no fuera así, se utilizarán condiciones de preparación y conservación adecuadas, toma y transporte de muestras.



- b) Deben establecerse normas de actuación en caso de accidente o avería en el transporte, así como las medidas de seguridad biológica.
- c) En caso de transporte de muestras entre laboratorios, seguir las normas del laboratorio de “destino”. Es responsabilidad del laboratorio de “origen” el cumplimiento de las normas necesarias para garantizar que la muestra llegue en perfectas condiciones para su estudio.
- d) En el transporte de las muestras se seguirán las siguientes normas específicas:
- Del domicilio al centro: Control de temperatura y tiempo de transporte.
  - Del punto de extracción periférico al laboratorio: Control de temperatura y tiempo de transporte.
  - Transporte intrahospitalario:
    - Manual: Control de temperatura y tiempo de transporte, especificado en Cartera de Servicios.
    - Neumático:
      - ☑ Evitar sistemas con paradas intermedias para disminuir aceleraciones/desaceleraciones.
      - ☑ Llenar los tubos al máximo (según instrucciones del fabricante) para disminuir la agitación.
- e) Personal que realiza el transporte:
- Transportista:
    - Personal habilitado para el transporte de muestras con relación contractual que determine condiciones, custodia y tiempos de transporte.
    - Formación específica para el transporte de muestras biológicas.
    - Actuar durante el transporte según las normas del laboratorio.
    - Priorizar el transporte de muestras sobre otras tareas.



► Celador/Paciente/Familiar:

- Se les indicarán las normas a seguir durante el transporte.

### 6. Recepción de las muestras.

El laboratorio dispondrá de un Manual de Normas de recepción y aceptación de muestras.

a) Recepción de muestras procedentes de centros de extracción:

► Entrega por el transportista:

- El transportista entregará las muestras y los volantes de solicitud.
- Firmará en la hoja de ruta y anotará la hora de entrega.
- Registrará en la hoja de ruta cualquier incidencia durante el transporte.
- Obtendrá copia de la hoja de ruta firmada por el responsable de la recepción, en la que se especificará si hay rechazos y la causa.

► Recepción:

- El responsable de la recepción debe confirmar la entrega de las muestras y las solicitudes.
- El responsable debe recoger las incidencias comunicadas por el transportista.

b) Recepción de muestras obtenidas en el hospital, procedentes de centros de extracción o entregadas directamente por el paciente/familiar:

- Comprobación de la correspondencia de la muestra con la solicitud.

### 7. Requisitos de las muestras.

El laboratorio de Microbiología debe determinar si la muestra cumple los requisitos para ser procesada. Entre otros, incluyen:

a) Correcta identificación.



- b) Comprobación de la idoneidad de la muestra para la realización completa de las pruebas solicitadas.
- c) Condiciones adecuadas de transporte y conservación.

Las muestras y/o solicitudes que no se adapten a las normas de calidad preanalíticas establecidas serán rechazadas.

#### **8. Criterios de aceptación/rechazo de las muestras. Protocolos de decisión.**

Las incidencias más frecuentes y las acciones a realizar son las siguientes:

- a) Muestra deficientemente identificada. Se contactará con el servicio peticionario.
- b) Muestra derramada. Se solicitará nueva muestra.
- c) Transporte/conservación inadecuada. Se solicitará nueva muestra.

#### **9. Registro de solicitudes.**

Si una muestra es apta para ser procesada, se procederá al registro de los datos de la solicitud de muestra, de forma manual o en soporte informático, según el procedimiento establecido en el Laboratorio.

#### **10. Preparación de las muestras.**

- a) Clasificación de las muestras en función del laboratorio o rutina de destino.
- b) Centrifugación de las muestras según las especificaciones internas del laboratorio.
- c) Quitar los tapones a los tubos las especificaciones del laboratorio, teniendo en cuenta los aspectos de seguridad biológica.
- d) Preparación de alícuotas. Identificación del tubo principal y de las alícuotas (código de barras o identificación propia de cada laboratorio o rutina).
- e) Preparación de otras muestras biológicas para los diferentes estudios.



## **11. Conservación de las muestras tras su procesamiento.**

Mantener todas las muestras (procesadas y rechazadas) a temperatura ambiente, refrigeradas o congeladas, según los protocolos, durante un tiempo que garantice que un problema en el procesamiento o en la interpretación de los resultados obtenidos pueda ser solucionado recuperando la muestra para un nuevo procesamiento (normalmente entre 1 y 3 días).

Ejemplos de ellos son la solicitud de la muestra, las instrucciones al paciente, la toma de la muestra, el procedimiento después de la toma de la muestra, el transporte, su registro, los criterios de selección, el volumen de muestra solicitado, el personal entrenado para la toma de la muestra, la documentación pertinente y la supervisión del proceso por parte de la gerencia del laboratorio.

## **Fase examen o fase analítica**

En esta etapa se realizan las mediciones y observaciones en las diversas áreas que cubre el laboratorio. Cada procedimiento de análisis debe describir no sólo las mediciones y observaciones implementadas en el laboratorio, sino también la verificación de las características de ejecución que pretende el autor o fabricante del sistema analítico. Además, los procedimientos de control corresponden a cada medición y observación y deben describirse, incluyendo los aspectos de control interno y evaluación externo de la calidad. Algunas veces los valores obtenidos son variables continuas (método cuantitativo), por ejemplo, los valores de las concentraciones de colesterol y de glucosa en suero. En otros casos las variables son discretas (semi-cuantitativas y cualitativas), por ejemplo, la clasificación de un microorganismo o parásito o la sensibilidad de una bacteria a los antibióticos. En todos los casos, en la fase analítica deben considerarse una medición u observación y un procedimiento control.<sup>5</sup>

A continuación, se realizará una descripción de los aspectos considerados en esta fase para el área de microbiología, por ser de interés para este manual.

El control de calidad interno consiste en aplicar diversos procedimientos periódicos dirigidos a la comprobación de las condiciones operativas de los aparatos e instrumentos y de los medios de cultivo, reactivos, tinciones y antiseros que se utilizan en el trabajo diario, los que deben ser bien seleccionados y tener características óptimas.



Con base en el libro “Mejoría continua de la calidad” se mencionan los aspectos a considerar en esta fase, los cuales se menciona a continuación: <sup>5</sup>

### **1.- Control de calidad del equipo.**

Se deben realizar comprobaciones periódicas del funcionamiento del equipo y establecer un registro de las comprobaciones realizadas de dichos equipos. La cooperación de los servicios técnicos de los fabricantes puede ser necesaria para el mantenimiento preventivo de los equipos.

### **2.- Control de calidad de cajas con medios de cultivo.**

En la preparación de los medios de cultivo se tiene que asegurar su preparación adecuada, para ello se realizan tres tipos de control:

#### **a) De esterilidad.**

Se toma un porcentaje de cajas y tubos de cultivo de cada lote de producción, por ejemplo, un 5%. Aleatoriamente o sistemáticamente de acuerdo a un plan documentado de muestreo y se somete a control de esterilidad. Los medios se incuban durante 2 días (para bacterias) a 35-36 °C y durante 5 días (para hongos) a temperatura ambiente. No debe de haber crecimiento.

#### **b) De calidad.**

Algunas cajas o tubos de cada lote de producción se incuban con al menos dos tipos de especies de microorganismos que crecen en ese medio, uno que revela un grupo de especificaciones y otro que revela otro grupo. Por ejemplo, si un medio de cultivo es selectivo uno de los microorganismos deberá crecer y el otro no.

#### **c) De fecha de caducidad.**

Cada caja de cultivo debe marcarse con el nombre del medio de cultivo y la fecha de su preparación. Por lo general, las cajas de cultivo que se mantienen en el refrigerador a 4 °C sin protección duran aproximadamente 15 días y las que se colocan dentro de una bolsa de plástico, alrededor de 2 meses.



### **3.- Control de calidad de exámenes bioquímicos.**

Incluye las supervisiones de medio de diferenciación, formas de identificación, reveladores de reactivos, y reactivos que por sí solos pueden revelar alguna propiedad bacteriana (oxidasa, catalasa, entre otros). Algunas pruebas de identificación se realizan en cajas de Petri (prueba de CAM, DNAsa, entre otros), sin embargo, la mayoría de los análisis bioquímicos se hacen en tubos de ensaye. Estos medios se comprueban con los mismos métodos que las cajas.

### **4.- Control de calidad de reactivos, tinciones, discos y antisueros.**

#### a) Los reactivos químicos y las tinciones.

Estos se revisan con respecto a las mismas características que los medios de cultivo. No es necesario que los controles de esterilidad sean tan estrictos como para los medios de cultivo, sin embargo, es recomendable que estos materiales también estén libres de bacterias (muertas o vivas) que puedan falsear resultados con respecto a los microorganismos que se encuentran en la muestra. Los reactivos y tinciones pueden provenir de fábrica o se preparan en el laboratorio a partir de productos puros que ya han sido revisados en su lugar de fabricación, sin embargo, es preferible comprobarlos con microorganismos control. Se debe registrar la fecha de arribo de cada producto, se du fecha de preparación y de caducidad y almacenar los productos como lo indica el fabricante. Los reactivos de uso no muy frecuente se deben de comprobar antes de cada uso; los reactivos de uso frecuente, una vez por semana. Es importante probarlos con una cepa control “positiva” una “negativa”.

- Tiras y discos de diferenciación bacteriana (oxidasa, bacitracina, optoquina, factores V y X, entre otros).

Estos se deben guardarse en refrigeración dentro de un desecador. Los reactivos y discos se controlan al recibirlos y una vez por semana.

Los discos de sensibilidad antimicrobiana se refrigeran a 4 °C. Una excepción son los discos betalactámicos que deben ponerse en desecador y mantenerse en congelador a -20 °C.

- Los antígenos que se utilizan para caracterizar anticuerpos de microorganismos en suero de pacientes ser refrigeran a 4 oC. Es importante mantener un registro exacto



de las fechas de arribo y caducidad. También debe registrarse la fecha de primer uso y la fecha de reconstitución de reactivos liofilizados y probarse con anticuerpos de control “positivos” y “negativos”. Todos los reactivos caducos o los que muestren cambios de color o viscosidad deben rechazarse por probable contaminación.

## 5.- Control de la metodología.

Los procedimientos apropiados se toman de las recomendaciones más recientes de organizaciones reconocidas que determinen procedimientos nuevos por consensos por ejemplo de la CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), o que se especialicen en microbiología como la Sociedad Americana de Microbiología.

Los procedimientos de exámenes que se siguen en el laboratorio de microbiología deben de registrarse en un Manual General de Laboratorio, el cual debe revisarse y ponerse al día, con todas las actualizaciones firmadas una vez al año.

## Fase post-examen o posanalítica

La fase del proceso post-examen conlleva a la revisión sistemática de los resultados obtenidos, y por consiguiente al reporte final. Este reporte de resultados se debe acompañar de un procedimiento que abarque todos los pasos del proceso en donde aspectos como: transcripción de resultados, calidad de la muestra, resultados incorrectamente reportados, etc., estén bien detallados con el fin de dar una información certera y confiable al usuario.<sup>2</sup>

En los documentos “recomendaciones para el control de calidad interno en Microbiología Clínica”<sup>3</sup> y “Gestión de la calidad en el Laboratorio Clínico”<sup>4</sup> se describen las etapas de esta fase, las cuales se mencionan a continuación:

### 1.- Validación clínica de los resultados.

En esta última actuación antes de la entrega del informe se estudia la congruencia del resultado del informe o de varios resultados de un mismo informe, se cotejan los resultados con los de informes precedentes y se verifica su coherencia con los datos fisiológicos y clínicos del paciente.



Esta validación clínica ha de realizarla un especialista en Microbiología. La validación clínica incluye la repetición o ampliación de exploraciones. La firma de la persona autorizada que valida el informe puede establecerse a través de sistemas electrónicos o autorizaciones escritas que garanticen la identidad de la persona que valida.

### 2.- Elaboración y edición del informe.

Una vez comprobados los resultados, el especialista en Microbiología aportará al informe los comentarios que considere necesarios para:

- a) Ayudar a la interpretación de los mismos.
- b) Indicar nuevas exploraciones.
- c) Aconsejar pautas clínicas.

### 3.- Transporte del informe.

Debe garantizarse la confidencialidad de los datos en todo momento.

- a) Entrega de resultados: Se entregarán en el plazo establecida para cada prueba.
  - Resultados urgentes: se establecerá el mecanismo adecuado que garantice la recepción del informe, por parte del médico responsable del paciente, en el menor plazo posible desde su edición.

Instaurar sistemas que permitan entregar los resultados directamente en el destino final, con el fin de agilizar la entrega y evitar pérdidas.

- b) Sistemas de transporte:
  - Informe impreso y reparto manual. Registro donde quede constancia de la persona que hace el reparto y la que lo recibe (hoja de ruta de informes).
  - Informe electrónico. Cuando el envío se realice por sistema electrónico (intranet, web, correo electrónico, fax, impresión remota) se establecerán medios alternativos en previsión de fallos en dichos sistemas.



#### 4.- Distribución del informe.

- a) La distribución se hará de forma que se facilite la llegada rápida a su destinatario. El responsable del laboratorio implantará estrategias que eviten errores de destino, recogidas en el manual correspondiente que editará el laboratorio dentro de su documentación.
- b) En caso de que se produzcan errores en la entrega y distribución de resultados, estos quedarán reseñados en un registro de reclamaciones para su análisis y proposición de las acciones correctoras pertinentes.
- c) Si se emite un duplicado de informe, la fecha de emisión debe ser la de la impresión original del mismo, haciendo constar que se trata de una copia y la fecha de la misma.
- d) Los informes son confidenciales, por lo que el laboratorio instaurará los mecanismos que garanticen que todo el personal mantendrá un estricto control de la custodia y confidencialidad de los datos del paciente.
- e) El laboratorio establecerá los procedimientos correspondientes para garantizar la trazabilidad del proceso de información de los resultados.

#### 5.- Recepción del informe.

- a) La recepción de los informes quedará registrada en la hoja de ruta de recepción de los informes.
- b) Se comprobará la recepción de todas las peticiones realizadas.
- c) Se registrarán las reclamaciones sobre informes no recibidos o incompletos indicando motivo y procedencia.

En la siguiente figura se muestra un resumen de las fases del control interno de la calidad en el área de Microbiología.



### Fase preanalítica o pre-examen

- 1.- Solicitud de la muestra u hoja de petición.
- 2.- Cita para la toma de muestras
- 3.- Obtención de las muestras.
- 4.- Preparación de las muestras.
- 5.- Transportet de las muestras.
- 6.- Recepción de las muestras.
- 7.- Requisitos de las muestras.
- 8.- Criterios de aceptación/ rechazo de las muestras . Protocolo de decisión.
- 9.- Registro de solicitudes.
- 10.- Preparación de las muestras.
- 11.- Conservación de las muestras tras su procesmiento.

### Pase analítica o examen

- 1.- Control de calidad en equipo.
- 2.- Control de calidad de cajas con medios de cultivo.
- 3.- Control de calidad de exámenes bioquímicos
- 4.- Control de calidad de reactivos, tincions, discos y antisueros.
- 5.- Control de la metodología.

### Fase postanalítica o post-examen

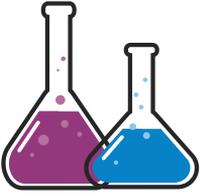
- 1.- Validación clínica de los resultados.
- 2.- Elaboración y edición del informe
- 3.- Transporte del informe.
- 4.- Distribución del informe.
- 5.- Recepción del informe.



## Referencias

1. Morales-Parra GI, Castro-Amaris G, Mendoza-Bolaño YC, Rubiano-Orozco LA, Pacheco-Villa JM. Una mirada rápida al control de calidad interno en el quehacer diario del laboratorio de microbiología. Med. Lab. [Internet]. 1 de septiembre de 2017 [citado 25 de enero de 2022];23(9-10):459-74. Disponible en: <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/24>.
2. Sierra Amor, Rosa Isabel. El laboratorio clínico y el control de calidad. Bioquímica [Internet]. 2006;31(2):39-40. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57631201>
3. Gimeno, C.C. Recomendaciones generales para el control de calidad interno en Microbiología Clínica. España: Facultad de Medicina; 2016. Disponible en: [gegmic\\_dyc1\\_2004.pdf](#) (seimc.org).
4. Fernández, E.C., Mazziotta, D. Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico. México: Editorial Medica Panamericana; 2005, 556 p.
5. Castillo de Sánchez M.L., Fonseca Yerena M.E. Mejoría continua de la calidad: Guía para los laboratorios clínicos de América Latina. México: Editorial Médica Panamericana; 1995, 314 p.





# Reglamento del laboratorio

---

## Indumentaria de seguridad

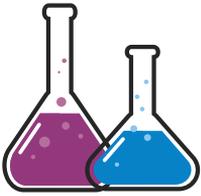
1. Se deberá usar bata blanca de algodón, limpia, presentable y debidamente abotonada (cerrada).
2. Se deberán usar guantes, cubrebocas, y el uso de goggles (cuando se requiera), durante el trabajo en el laboratorio.
3. Se deberá recoger el cabello para evitar accidentes o bien se recomendará el uso de cofia.
4. Está prohibido el uso de cualquier indumentaria de seguridad (bata, guantes, cubrebocas, entre otras) fuera del laboratorio.

## Prácticas microbiológicas estándar<sup>4</sup>

1. El acceso al laboratorio estará limitado o restringido a criterio del grupo de profesores cuando se están llevando a cabo experimentos o trabajos con cultivos y especímenes.
2. Se contará con una tolerancia de 10 minutos para ingresar al laboratorio después de la hora de entrada.
3. Se deberá lavar las manos: al inicio del trabajo en el laboratorio; antes de colocarse los guantes; después de manipular materiales viables, después de quitarse los guantes y antes de retirarse del laboratorio.



4. Se deberán limpiar las mesas de trabajo con solución desinfectante, antes y después del trabajo en el laboratorio, así como después de cualquier derrame de material biológico.
5. No estará permitido comer, beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo.
6. No se debe pipetear con la boca; se utilizan dispositivos pipeteadores mecánicos.
7. Todos los procedimientos se llevan a cabo con precaución a fin de minimizar la creación de salpicaduras o aerosoles. Se debe tratar de reducir al máximo la producción y liberación de aerosoles, evitando: agitaciones y pipeteo bruscos, introducción de asas de cultivo calientes dentro de medios de cultivo, etcétera.
8. Se deberán colocar los objetos cortantes y punzocortantes, en los contenedores, ubicados en el laboratorio.
9. Los cultivos derivados del trabajo en el laboratorio se deberán descontaminar antes de ser desechados mediante un método de descontaminación aprobado, como, por ejemplo, mediante autoclave o por inmersión en desinfectantes apropiados. Los materiales que se deben descontaminar fuera del laboratorio deberán ser colocados en los recipientes expreso para ello, ubicados en el laboratorio.
10. Se debe colocar una señal de advertencia de riesgo biológico en la entrada del laboratorio cuando se encuentren presentes agentes infecciosos. La señal debe incluir el nombre del agente o agentes en uso y los datos para contactar a los profesores responsables.



# Dinámica y criterios de evaluación del trabajo en el laboratorio

## Dinámica del trabajo en el laboratorio

1. Las actividades en el laboratorio corresponden a la realización de 9 prácticas distribuidas por órganos y sistemas, de la siguiente manera:
  - Una práctica para piel y músculo esquelético
  - Una práctica para aparato gastrointestinal
  - Tres prácticas para el aparato respiratorio
  - Una práctica para el aparato circulatorio, y
  - Tres prácticas para el aparato genitourinario.
2. Se aplicará un examen previo a cada una de las prácticas.
3. Se expondrá un seminario en power point con una duración de entre 20 y 30 minutos, antes cada una de las prácticas. Este seminario se calificará con la “Rúbrica para evaluar la presentación en power point de las presentaciones previas a cada práctica”. (Anexo X)
4. Se considera para el trabajo en el laboratorio los aspectos considerados en la lista de cotejo (Anexo XI)
5. Se entregará el reporte de resultados al finalizar cada una de las prácticas.



## Criterios de evaluación

La evaluación del trabajo de laboratorio considera los siguientes aspectos:

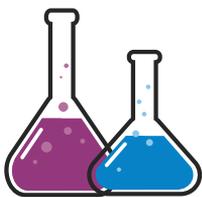
- |                          |     |
|--------------------------|-----|
| a) Examen previo         | 30% |
| b) Seminario             | 20% |
| c) Lista de Cotejo       | 30% |
| d) Reporte de resultados | 20% |

Es importante mencionar que, para promediar los porcentajes de las calificaciones para cada uno de los aspectos antes considerados, las calificaciones deberán ser mayores o iguales a 6 (seis).

Los exámenes previos es el único aspecto que, en caso de reprobarse, habrá un examen de reposición al final del semestre, con los siguientes criterios:

- Si se reprobaban hasta tres exámenes previos, los podrá presentar por práctica.
- Si se reprobaban más de tres exámenes previos tendrá que presentar un examen global de todo el laboratorio.

Con base a lo anterior se espera un desempeño favorable de los alumnos de inicio a fin del semestre, ya que, de no acreditar los seminarios, la lista de cotejo y el reporte de resultados, no acreditará el laboratorio.



# Unidad Piel y músculo esquelético

## PRÁCTICA I Aislamiento de hongos de uñas causantes de micosis



Elaborado por:  
Q.F.B. Ana Laura Loreto Pérez  
Dr. Roberto Cruz González Meléndez



# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>49</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>52</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>54</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>55</b>
V.1 Fase Preanalítica	55
V.2. Fase Analítica	61
V.3. Fase Postanalítica	74
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>74</b>



## I. Introducción

Tiña de las uñas es el término para describir el compromiso de las uñas por hongos dermatofitos que debe diferenciarse de la onicomicosis la cual se refiere a las infecciones causadas por una amplia variedad de hongos que no pertenecen a los dermatofitos.

Entre los dermatofitos, el *Trichophyton rubrum* es el principal responsable, seguido por el *T. mentagrophytes var. interdigitale*, posteriormente por el *Epidermophyton floccosum*. Las tiñas de las uñas comienzan en el borde lateral o distal de la placa ungular y producen inflamación paroniquial a medida que la lesión progresa, la uña se engrosa y se torna quebradiza, con la acumulación subungular de detritos queratinizados (hiperqueratosis).<sup>(1, 2)</sup>

La onicomicosis constituye una de las enfermedades más frecuentes de las uñas y en constante aumento. Es producida por levaduras o por hongos oportunistas no dermatofitos como las especies de *Aspergillus sp.*, especies de *Geotrichum sp.* En menor medida especies como *Acremonium spp.*, *Scopulariopsis brevicaulis* y *Fusarium spp.* Se puede presentar en forma aislada, pero en la mayoría de los casos se presenta asociada con tinea pedis o tinea manuum.<sup>(1)</sup>

Otros hongos capaces de invadir la lámina ungueal son levaduras como *Candida albicans* y *C. parapsilosis*. Los hongos filamentosos y las levaduras son generalmente invasores secundarios a enfermedades previas de la uña o traumatismos, mientras que los dermatofitos pueden causar infecciones primarias.<sup>(3)</sup>

La incidencia de las onicomicosis aumenta con la edad, con una prevalencia neta por encima de los 55 años, con mayor predominio en los varones.

Los factores predisponentes son las distrofias ungulares, los microtraumatismos continuos, trabajos y deportes, los defectos circulatorios arteriales, venosos o linfáticos, las neuropatías periféricas, la diabetes mellitus, el tabaquismo, las deficiencias inmunitarias, las enfermedades preexistentes como psoriasis. También el envejecimiento de la población y el afán actual por el bienestar corporal (piscinas, saunas, etc.) tienen una participación importante para condicionar o favorecer la infección micótica de la uña.<sup>(3)</sup>

La comprensión de la patogenia de las infecciones en la uña requiere el conocimiento de la anatomía y la fisiología de la misma.<sup>(3)</sup>



La sospecha clínica de onicomicosis debe confirmarse siempre a través del examen microscópico directo y del examen por cultivo.

Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Fase preanalítica:** es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma. Se indica las propiedades de los reactivos que serán empleados, y en este caso la correcta manipulación de las cepas, más representativas a utilizar para cada módulo.

**Fase analítica:** se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados (en los manuales de procedimiento de Operación y Mantenimiento Preventivo de los Equipos utilizados en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas y se describen las especificaciones y características de los instrumentos, sus normas de funcionamiento, calibración) y reactivos.

Se explica ampliamente como realizar un examen directo para poder efectuar una interpretación, de igual manera se explican las propiedades de los medios de cultivo selectivos, diferenciales, de transporte, medios de enriquecimiento y pruebas bioquímicas y especiales. También se explica los métodos actuales de diagnóstico como el sistema API 20 y el uso de los medios cromogénicos.

**Fase postanalítica:** se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

Sin embargo, aún establecidas estas tres etapas en escrito, el control de calidad es responsabilidad de la persona a cargo del área de microbiología, que debe asegurarse de que las pruebas realizadas sean procesadas con calidad y de que los resultados sean confiables, reproducibles y tan exactos como sea posible, siguiendo los procedimientos establecidos. Los resultados se deben de entregar en un informe que sea legible y fácil de comprender. <sup>(4)</sup>



En el presente trabajo se establecen los métodos tradicionales y métodos alternativos de diagnóstico (sistema API 20 y medios cromogénicos) empleados para el diagnóstico microbiológico de microorganismos causantes de onicomicosis en uña de pie, el estudio se realizará en el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la FES Zaragoza y por último se pretende implementar estos métodos en la clínica multidisciplinaria de la FES Zaragoza.

Debido a que no se cuenta con prácticas desde el punto de vista patológico, es decir, prácticas que permitan el diagnóstico de microorganismos que causan patologías en aparatos y sistemas del cuerpo humano. Para ello, se pretende diseñar prácticas encaminadas al diagnóstico microbiológico de microorganismos causantes de patologías diversas, con el objeto de una mejor comprensión de la identificación de los microorganismos por género y especie.

Cabe señalar que al final del manual aparece un cuestionario que tiene por objetivo conocer las opiniones de alumnos y profesores estableciendo un proceso de mejora continua de esta práctica.

## II. Objetivos

-  Utilizar los procedimientos de los métodos: tradicional y alternativo de diagnóstico microbiológico para la identificación de microorganismos probables de onicomicosis.
-  Utilizar sistema API20 y medios cromogénicos como métodos alternativos de diagnóstico.
-  Utilizar cepas de *Candida albicans* como control de calidad en los métodos: tradicional y alternativo de diagnóstico.



### III. Medidas de bioseguridad

De acuerdo con la publicación de la OMS en 2005 se hace referencia a los peligros relativos que entrañan los microorganismos clasificándolos por grupos de riesgo. Y esta clasificación se utiliza exclusivamente para el trabajo de laboratorio. Existe una relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad y con ello la clasificación del tipo de laboratorio y el equipo de seguridad.

La asignación de un nivel de bioseguridad tiene en consideración el microorganismo (agente patógeno) utilizado, las instalaciones disponibles, el equipo, las prácticas para trabajar con seguridad en el laboratorio. Por ello el nivel de bioseguridad que tiene el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la FES Zaragoza es nivel 1.

Grupo de riesgo	Nivel de bioseguridad	Tipo de laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipo de seguridad
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	Técnicas microbiológicas apropiadas	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto

Grupo de riesgo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo): microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o en animales.

Cada laboratorio debe adoptar un manual de seguridad o de trabajo en el que identifiquen los riesgos conocidos y potenciales y se especifiquen las prácticas y los procedimientos encaminados a eliminar o reducir al mínimo esos riesgos.

A continuación, se mencionan algunos aspectos importantes.

#### Protección personal:

-  Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio. (Fig. 1)
-  Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales



potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos. (Fig. 1)

- 🧪 El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
- 🧪 Se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
- 🧪 Estará prohibido usar prendas protectoras fuera de laboratorio.
- 🧪 En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
- 🧪 La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios que la ropa de calle.



**FIGURA 1.** Protección personal.

### Zonas de trabajo del laboratorio:

- 🧪 El laboratorio se mantendrá ordenado y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- 🧪 Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso, al inicio y al final de cada jornada de trabajo



### **Manipulación de desechos:**

Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. 6



## **IV. Propósito del examen**

Esta práctica está encaminada al diagnóstico microbiológico de patógenos causantes de onicomicosis en uña de pie. Se utilizarán dos métodos: método tradicional y un método alternativo de diagnóstico (medios cromogénicos y sistema API 20), empleando cepas puras de *C. albicans* como control de calidad. Con el objetivo de conocer los fundamentos y pasos a seguir de los mismos. Por último y de manera significativa se pretende mejorar el proceso de enseñanza y aprendizaje, así como mejorar la preparación académica de los alumnos que cursan el módulo de laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas.

Los alumnos tendrán los conocimientos básicos teóricos y prácticos necesarios para cada una de las etapas de control de calidad de la práctica.



## V. Metodología

### V.I Fase Preanalítica

#### INDICACIONES Y PRECAUCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA

- 1) Se debe indicar al paciente las siguientes condiciones previas para la toma de muestra.
  -  No tomar tratamiento antifúngico previo a la toma de muestra, en caso afirmativo se retrasa la toma de muestra una o dos semanas
  -  Evitar cremas o pomadas en las uñas antes de la toma de muestra.
  -  No llevar barniz en uñas de los pies.



- 2) Antes y después de cada procedimiento lavarse las manos correctamente.





- 3) Utilizar guantes y cubrebocas.



- 4) Limpiar la zona con alcohol al 70% o realizar un lavado con jabón, eliminando restos de pomadas, suciedad y restos epidérmicos.





**EQUIPO Y REACTIVOS**

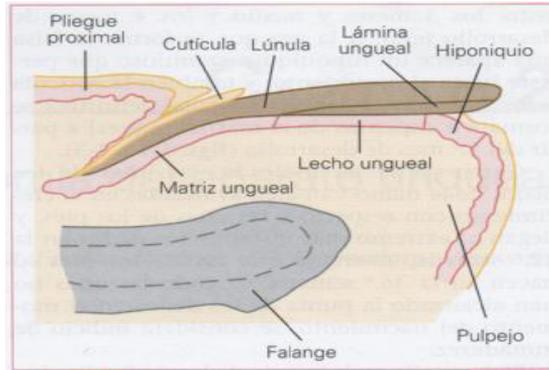
MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alicates para uñas</li> <li>• Bisturí</li> <li>• Asa micológica</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Cubreobjetos</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Mechero Fisher</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidróxido de potasio (KOH) al 40%</li> <li>• Azul de lactofenol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Sabouraud</li> </ul>





## PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA

- 1) Identificar el tipo de lesión, según las modalidades de invasión del aparato ungular, las onicomicosis pueden presentarse en tres formas clínicas principales. Para ello se tendrá en cuenta que la comprensión de la patogenia de las infecciones en la uña requiere el conocimiento de la anatomía y la fisiología de la misma. <sup>(3,5)</sup>



Morfología de uña sana <sup>(5)</sup>

**Onicomicosis subungueal distal y lateral.** Es la más frecuente. La infección se inicia en el borde libre y se extiende en sentido proximal hacia la matriz. Se observa un cambio de color, hiperqueratosis, engrosamiento e irregularidades en la superficie.





**Onicomycosis blanca superficial.** El hongo invade directamente la lámina ungueal, pudiendo infectar el lecho ungueal y el hiponiquio. La uña muestra un color blanquecino y aspecto quebradizo. Se puede dar la destrucción de la uña.



**Onicomycosis distrófica total.** Suele tener varios años de evolución. Afecta a la totalidad de la uña, con una intensa hiperqueratosis en el hiponiquio. Lámina ungueal engrosada, abombada o curvada. Puede desprenderse total o parcialmente.



**Onicomycosis por Cándida.** Se da en uñas expuestas a humedad e hiperhidrosis y previamente alteradas. Los surcos periungueales pueden ser edematosos y dolorosos. Puede drenar una pequeña cantidad de pus blanquecino o amarillento. Por último, tiene lugar una infección crónica de toda la uña, con estrías longitudinales, irregularidades en la superficie, onicolisis y cambios de coloración.





**Onicomicosis subungueal proximal.** La menos común en personas sanas. La infección se inicia en la cutícula o eponiquio y se extiende en sentido distal hacia el borde libre. Se observan lesiones blanquecinas en la zona de la lúnula. Es la forma más infrecuente, pero más significativa, por cuanto afecta casi con exclusividad a individuos inmunodeprimidos, sobre todo HIV+.



- 2) Una vez identificado el tipo de lesión en la uña se procede a recortar con tijeras o alicates de podólogo para uñas de pies, procurando llegar hasta la frontera entre la invasión fúngica y la zona de uña sana.





- 3)** Raspar con el bisturí, procurando que la muestra quede en el portaobjetos (obtener suficiente muestra para el examen directo y para los medios de cultivo)



## **V.2. Fase Analítica**

En esta fase se describen los métodos de diagnóstico: tradicional (A) y alternativo (B), los cuales son explicados a manera de resumen en la siguiente tabla (Tabla 2), mostrando el procedimiento a seguir para el diagnóstico microbiológico a partir de muestra clínica o partiendo de cepas puras. Posteriormente ambos métodos (A y B) serán detallados de forma clara, precisa y sencilla.



**TABLA 2.** Procedimiento del método: tradicional y método alternativo de diagnóstico.

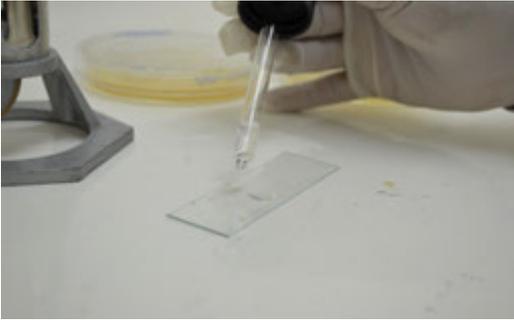
(A) Método tradicional		(B) Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar		Origen de la muestra a analizar	
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
<p><b>Realizar las siguientes actividades:</b>  <b>Examen directo.</b>            Cultivo en agar Sabouraud.            ↓            Incubar a 25 °C por dos semanas.            ↓            Examen macroscópico y microscópico.            ↓            Microcultivo para identificación de hongos filamentosos.            ↓            Examen microscópico utilizando objetivos 10X y 40X.</p>		<p><b>Realizar las siguientes actividades:</b>  <b>Manejo del sistema API20C:</b>            ↓            A partir de un cultivo joven de la levadura, realizar una suspensión en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.            ↓            Con la ayuda de la micropipeta, transferir 100 microlitros (2 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Médium y homogeneizar evitando la formación de burbujas.            ↓            Llenar las cúpulas con la suspensión evitando la formación de burbujas y apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula.            ↓            Cerrar las cámaras de incubación.            ↓            Incubar a 30 °C durante 24-72 horas.</p> <p><b>Manejo de medios cromogénicos</b>            ↓            Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio.            ↓            Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 20 – 48 horas en posición invertida. Se requiere una incubación de 42 horas para que se desarrolle por completo el color de las colonias <i>Candida</i>.            ↓            Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.</p>	



## **A) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO TRADICIONAL**

### **EXAMEN DIRECTO**

- 1)** A la muestra obtenida en el portaobjetos se le coloca una gota de KOH al 40% y una gota de colorante azul de lactofenol.



- 2)** Cubrir con el cubreobjetos y calentar ligeramente la preparación a la llama de un mechero evitando la ebullición, hasta obtener una muestra completamente dissociada, es decir, hasta que el material queratinoso se haya disuelto bajo la acción del KOH al 40%.



- 3)** Observar la preparación al microscopio, utilizando los aumentos 10X y 40X e identificar las estructuras fúngicas.



- 4) Depositar una pequeña cantidad de muestra de uña en la superficie del medio de cultivo Sabouraud en tubos o en cajas Petri (trabajar siempre junto a la llama del mechero).



- 5) Incubar las cajas o tubos inoculados a 25 °C. Cuando se prolonga más allá de dos semanas, es aconsejable disponer las placas en bolsas de plástico cerradas, para evitar la desecación del medio.



**EXAMEN MACROSCÓPICO:**

- 6) Observar la morfología colonial característica del patógeno aislado en los medios de cultivo. Realizando la observación con el siguiente orden:
- Color: tanto anverso (micelio aéreo) como del reverso (micelio vegetativo).
  - Superficie: pulverulenta, vellosa, aterciopelada, algodonosa, etc.
  - Relieve: plano, crateriforme, elevado cupuliforme, radiado, etc.
  - Borde: entero, con vellosidades, etc.



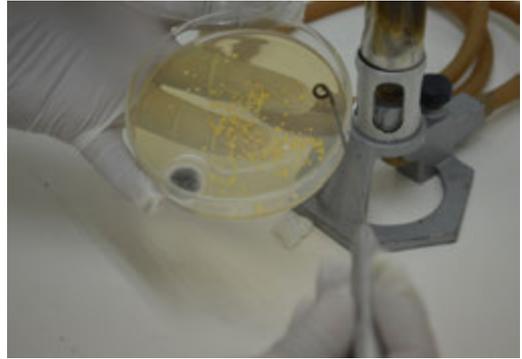
Crecimiento a la semana de inoculación.



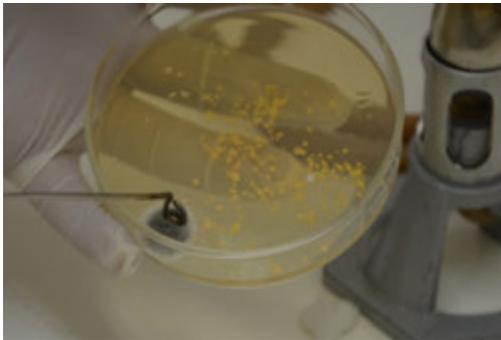
Crecimiento a las 2 semanas de inoculación.



- 7) Resembrar en medio Sabouraud en caso de obtener dos microorganismos (levaduras y hongo filamentoso), para la correcta identificación del hongo filamentoso.
- 8) Quemar al rojo vivo el asa micológica a utilizar.
- 9) Enfriar el asa en el agar sin tocar las colonias.



- 10) Tomar la colonia aislada con el asa del hongo filamentoso.
- 11) Tocar el nuevo agar con el asa que tocó la colonia del hongo filamentoso.



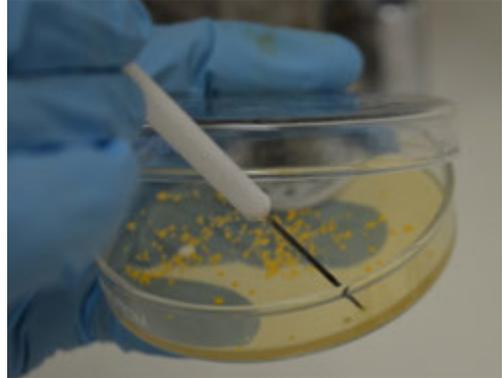


**EXAMEN MICROSCÓPICO:**

**12)** Obtener una pequeña muestra con un asa micológica y depositarla en un portaobjetos.



**13)** Colocar una gota de azul de lactofenol y colocar encima un cubreobjetos.



**14)** Observar la estructura fúngica en el microscopio utilizando objetivos 10X y 40X.

**15)** Realizar un microcultivo para la identificación correcta de hongos filamentosos.

**B) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO**

**MEDIOS CROMOGÉNICOS**

**METODOLOGÍA**

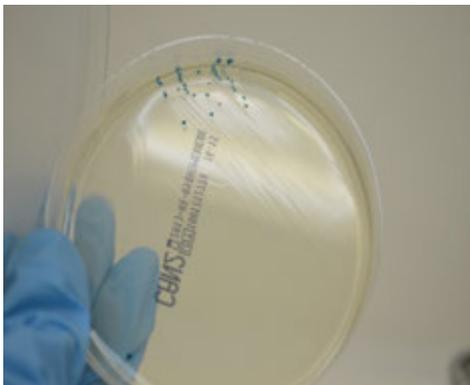
MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Cepa de <i>C. albicans</i></li> </ul>	-----	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CHROMagar Candida</li> </ul>



- 1) Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa.



- 2) Incubar las placas en atmósfera aerobia a  $35 \pm 2$  °C durante 20 – 48 hrs en posición invertida. Se requiere una incubación de 42 horas para que se desarrolle por completo el color de las colonias Candida.
- 3) Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.
- 4) Después de la incubación, las placas de las muestras con hongos presentarán crecimiento. Se recomienda efectuar la lectura de las placas sobre un fondo blanco. Si están presentes.





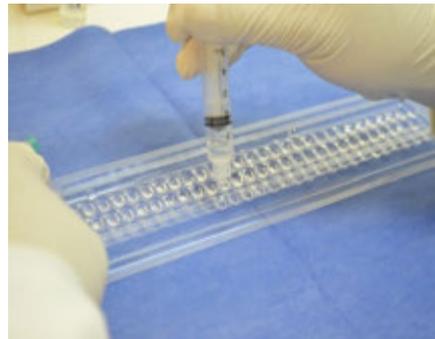
### API 20C AUX

#### METODOLOGÍA

MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Micropipeta</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	Ampolleta de C. Médium	Tiras API20C

#### PREPARACIÓN DE LA TIRA

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como  $Cl_2$ ,  $CO_2$ , etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.

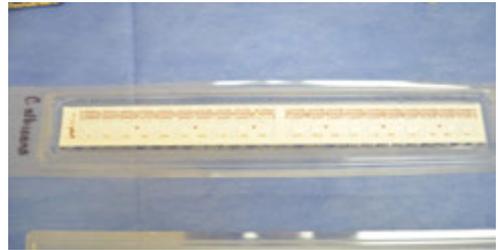
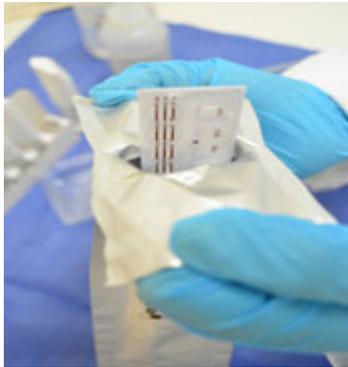




- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).



- 3) Sacar una galería API 20 Aux de su envase individual. 4) Colocar la galería en la cámara de incubación.

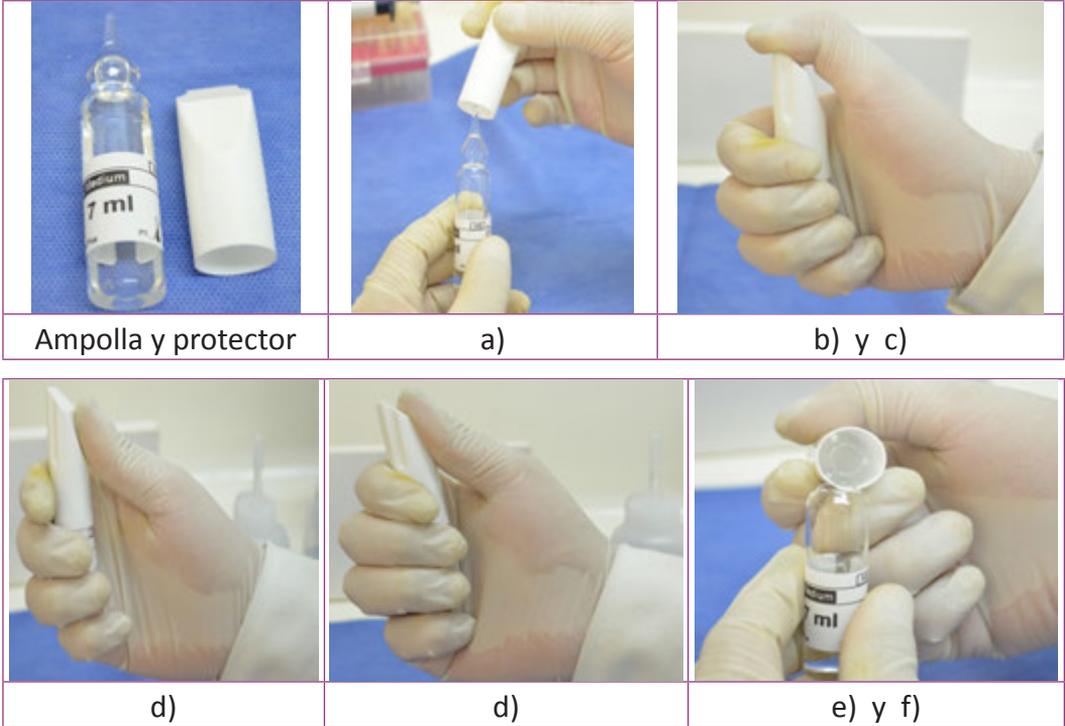


### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 5) Abrir una ampolla de API 20 Aux:
- Introducir la ampolla en el protector de ampolla (tapón blanco).
  - Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - Presionar a fondo el tapón blanco.
  - Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.



- e) Sacar la ampolla del protector de la ampolla y conservarla para un próximo uso.
- f) Retirar delicadamente el tapón.



- 6) A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland. Se recomienda utilizar cultivos jóvenes (18-24 horas). Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.



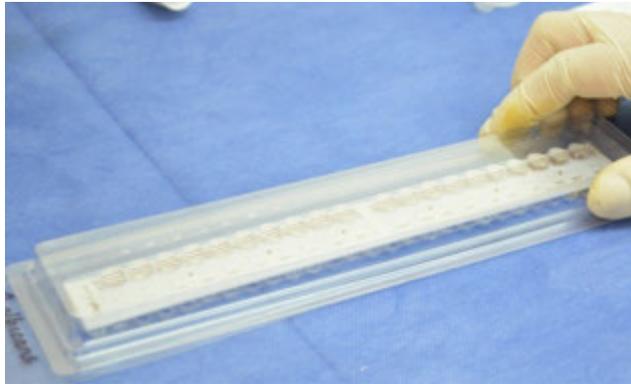


## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 7) Con la ayuda de la micropipeta, transferir 100 microlitros (2 gotas) de esta suspensión a una ampolleta de C Médiun y homogeneizar evitando la formación de burbujas. Llenar las cúpulas con la suspensión evitando la formación de burbujas y apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula.



- 8) Cerrar las cámaras de incubación e incubar a 30 °C durante 24-72 horas.

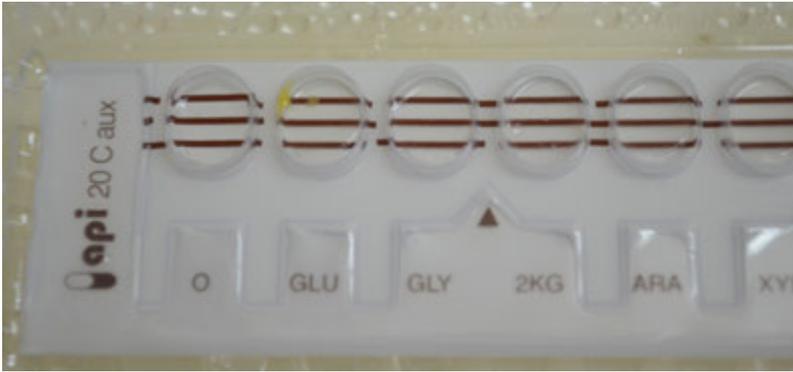


## LECTURA DE LA GALERÍA

- 9) Tras la incubación observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados. La lectura de los resultados se lleva a cabo



por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO II)



### DETERMINACIÓN DEL PERFIL NUMÉRICO E IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

**10)** Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres, en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes.

Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 o 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

-  Si la reacción es negativa se pone 0.
-  Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete (si hay presencia de turbidez o crecimiento de levaduras en el pocillo), 2 si es el segundo, 4 si es el tercero.
-  Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata.



**11)** Reportar los resultados de las pruebas.

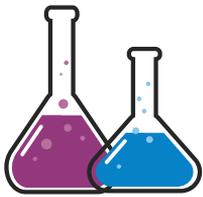


### V.3. Fase Postanalítica

De acuerdo con los resultados de las pruebas realizadas, se colocará el nombre del microorganismo patógeno identificado, así como la susceptibilidad a antifúngicos en el formato de resultados: informe del laboratorio. (ANEXO IV)

## VI. Referencias

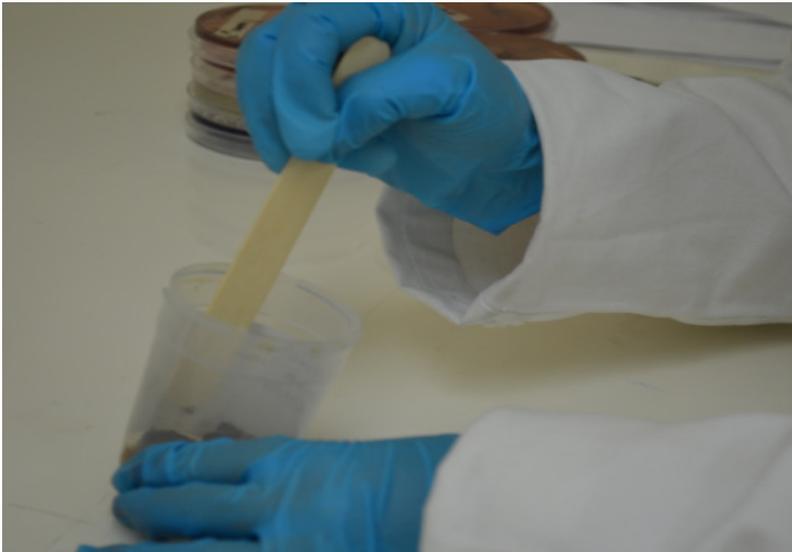
1. Lepori L. Mini atlas micosis cutánea. Buenos Aires: E. C. S. A; 2005.
2. Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W. Diagnóstico microbiológico texto y atlas color. 5ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2002.
3. Ballesté R., Mousqués N., Gezuele E. Onicomycosis. Revisión del tema. Rev Med Uruguay. 2003; 19: 93-106.
4. Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el laboratorio clínico. Buenos Aires: Panamericana; 2005.
5. Martínez A. Podología atlas de cirugía ungueal. Madrid: Médica Panamericana; 2006.
6. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 (jalisco.gob.mx).



# Unidad Aparato Gastrointestinal

## PRÁCTICA 2

### Diagnóstico de infecciones bacterianas del aparato gastrointestinal mediante el coprocultivo



**Elaborado por:**

Q.F.B. Ana Laura Loreto Pérez

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez



# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>77</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>81</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>81</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>84</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>84</b>
V.1 Fase Preanalítica	84
V.2. Fase Analítica	88
V.3. Fase Postanalítica	112
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>113</b>



## I. Introducción

Alguna vez en la vida todos experimentamos una diarrea. En general es poco más que una deposición acuosa molesta. Sin embargo, en los países en desarrollo es una de las causas principales de mortalidad infantil.

La enfermedad diarreica es la tercera causa de muerte a nivel mundial, precedida solo por las infecciones respiratorias y las perinatales. Se estiman cuatro millones de muertes anuales por complicaciones de las diarreas, en niños menores de cinco años.

La diarrea se ubica en un extremo del espectro de las infecciones intestinales y consiste en la pérdida de electrolitos y líquido, algunas veces en grandes cantidades. El ejemplo extremo de este problema es el cólera; “la diarrea del viajero” es una forma más leve en los adultos. En el otro extremo del espectro se hallan la diarrea hemorrágica y la disentería, enfermedades que ocurren cuando ciertos microorganismos invaden la mucosa intestinal, lo cual lleva a la inflamación y al daño tisular local.

Se produce una diarrea secretora cuando los microorganismos causales son capaces de colonizar el tubo digestivo. En todos los casos estos agentes deben superar múltiples defensas del huésped en el intestino delgado o grueso. Los patógenos también pueden producir poderosas toxinas que actúan en el intestino, denominadas enterotoxinas. Está involucrada una amplia variedad de bacterias diferentes, convenientemente denominadas “patógenos entéricos”.<sup>(1)</sup>

La diarrea infecciosa (evacuaciones intestinales frecuentes o sueltas, o de ambos tipos) se da en seis síndromes clínicos:

 **Intoxicación alimentaria:** A menudo se usa para referirse a cualquier enfermedad gastrointestinal consecutiva a la ingestión de alimentos; estrictamente significa enfermedad causada por alimentos que contienen toxina preformada.

 **Gastroenteritis:** Produce náuseas, vómito y diarrea. Puede haber malestar abdominal, cólicos y fiebre. Las causas más comunes son *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, especies de *Salmonella* y virus, entre los que se incluyen Rotavirus y Norovirus. Son causas más raras *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*.



-  **Disentería:** Diarrea con sangre y moco. Son comunes el dolor abdominal, los cólicos y la fiebre. La causa habitual es la infección invasiva del intestino grueso (por *E. histolytica* o *Shigella* spp.).
-  **Enterocolitis:** Inflamación del intestino grueso y del intestino delgado.
-  **Diarrea del viajero:** Enfermedad diarreica relacionada con viajes.
-  **Cólera:** Causas por *V. cholerae*; pérdida masiva de líquido por defecación. <sup>(2)</sup>

La mayoría de las bacterias que causan enfermedades diarreicas pertenece a una gran familia de bacilos gramnegativos, la *Enterobacteriaceae*, y algunos pertenecen a la familia *Vibrionaceae*.<sup>(1)</sup>

La familia *Enterobacteriaceae* son un vasto grupo heterogéneo de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino de humanos y animales. Esta familia incluye muchos géneros (por ejemplo, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros). Algunos microorganismos entéricos, como *E. coli*, forman parte de la microbiota e incidentalmente causan enfermedad, en tanto que otros, salmonelas y shigelas, con gran frecuencia son patógenas para humanos.

La familia *Enterobacteriaceae* muestra las siguientes características: son bacilos gramnegativos dotados de motilidad por flagelos peritricos o carentes de motilidad; crecen sobre peptona o medios con extracto de carne sin adición de cloruro de sodio ni otros suplementos; crecen bien en agar de McConkey; crecen en condiciones aerobias y anaerobias (anaerobios facultativos); fermentan la glucosa en vez de oxidarla y con frecuencia producen gas; son catalasa positivos, oxidasa negativos y reducen el nitrato en nitrito; poseen una estructura antigénica compleja y producen varias toxinas y otros factores de virulencia. <sup>(3)</sup>

El diagnóstico definitivo de las infecciones gastrointestinales bacterianas pasa por aislamiento del microorganismo en un coprocultivo. Para identificar al patógeno hay que recurrir a medios de cultivos enriquecidos, selectivos o diferenciales debido al alto grado de contaminación de estas muestras.

El coprocultivo es una prueba diagnóstica para el aislamiento e identificación de bacterias patógenas causantes de diarrea acuosa, diarrea hemorrágica o disentería. Los casos en los



que se realiza un coprocultivo son ante la sospecha de bacterias entéricas invasivas como *Salmonella* y *Shigella*, además *Yersinia* y *Vibrio*, mediante la observación del cuadro clínico, sobre todo de la presencia de fiebre.

Los leucocitos fecales son característicos de las diarreas inflamatorias. Suelen presentarse en infecciones bacterianas que invaden la pared intestinal como *E.coli enteroinvasiva*, *Shigella* y *Salmonella* spp, en colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn y en diarreas secundarias a antibióticos.

La ausencia de leucocitos fecales es típica de diarrea por virus, parásitos, bacterias enterotoxigénicas: *V. cholerae*, *B. cereus*, *E. coli* enterotoxigénica y portadores crónicos de *Salmonella*.

Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Fase preanalítica.** Es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma. Se indica las propiedades de los reactivos que serán empleados, y en este caso la correcta manipulación de las cepas más representativas a utilizar para cada módulo.

**Fase analítica:** Se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados y reactivos.

El control de estos sistemas se establece, y se describen las especificaciones y características de los instrumentos, sus normas de funcionamiento, calibración, o bien se hace referencia al manual de instrucciones del fabricante. Se explica ampliamente como realizar un examen directo para poder efectuar una interpretación, de igual manera se explican las propiedades de los medios cultivos selectivos, diferenciales, de transporte, medios de enriquecimiento y pruebas bioquímicas y especiales. También se explica los métodos alternativos de diagnóstico como el sistema API 20 y el uso de los medios cromogénicos.



Fase postanalítica. Se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

Sin embargo, aún establecidas estas tres etapas en escrito, el control de calidad es responsabilidad de la persona a cargo del área de microbiología, que debe asegurarse de que las pruebas realizadas sean procesadas con calidad y de que los resultados sean confiables, reproducibles y tan exactos como sea posible, siguiendo los procedimientos establecidos. Los resultados se deben de entregar en un informe que sea legible y fácil de comprender. <sup>(4)</sup>

En el presente trabajo se establecen los métodos tradicionales y métodos alternativos de diagnóstico (sistema API20 y medios cromogénicos) empleados para el diagnóstico microbiológico de enterobacterias patógenas que afectan el tracto gastrointestinal, para ser empleados en el módulo de Bacteriología y Micología Médicas.

Para ello, esta práctica presenta un formato novedoso y entendible, siguiendo los criterios de control de calidad. Esta práctica está encaminada al diagnóstico microbiológico de microorganismos causantes de patologías diversas, con el objeto de una mejor comprensión de la identificación de los microorganismos por género y especie.

Cabe señalar que al final del manual aparece un cuestionario (Anexo IX) que tiene por objetivo validar la utilidad de esta práctica, que con las opiniones de alumnos y profesores establecen un proceso de mejora continua de esta práctica.



## II. Objetivos

-  Utilizar los procedimientos de los métodos: tradicional y alternativo de diagnóstico microbiológico para la identificación de enterobacterias patógenas que afectan el tracto gastrointestinal.
-  Utilizar sistema API20 y medios cromogénicos como método alternativo de diagnóstico.
-  Utilizar cepas de enterobacterias patógenas (*Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*) como control de calidad en los métodos tradicional y alternativo de diagnóstico.

## III. Medidas de bioseguridad

De acuerdo con la publicación de la OMS en 2005 se hace referencia a los peligros relativos que entrañan los microorganismos clasificándolos por grupos de riesgo. Y esta clasificación se utiliza exclusivamente para el trabajo de laboratorio. Existe una relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad y con ello la clasificación del tipo de laboratorio y el equipo de seguridad.

La asignación de un nivel de bioseguridad tiene en consideración el microorganismo (agente patógeno) utilizado, las instalaciones disponibles, el equipo, las prácticas para trabajar con seguridad en el laboratorio (**Tabla 1**). Por ello el nivel de bioseguridad que tiene el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la FES Zaragoza es nivel 1.

**TABLA 1.** Relación del grupo de riesgo con el nivel de bioseguridad, las prácticas y el equipo.

Grupo de riesgo	Nivel de bioseguridad	Tipo de laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipo de seguridad
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	Técnicas microbiológicas apropiadas	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto



Grupo de riesgo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo): microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o en animales.

Cada laboratorio debe adoptar un manual de seguridad o de trabajo en el que identifiquen los riesgos conocidos y potenciales y se especifiquen las prácticas y los procedimientos encaminados a eliminar o reducir al mínimo esos riesgos.

A continuación, se mencionan algunos aspectos importantes en cuanto a las medidas de bioseguridad.

### Protección personal:

-  Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
-  Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos (Figura 1).
-  El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
-  Se usarán gafas de seguridad o viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
-  Estará prohibido usar prendas protectoras fuera de laboratorio.
-  En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
-  La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios o taquillas que la ropa de calle.



**FIGURA 1.** Protección personal.

**Zonas de trabajo del laboratorio:**

-  El laboratorio se mantendrá ordenado y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
-  Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso, al inicio y al final de cada jornada de trabajo. <sup>(5)</sup>

Manipulación de desechos: Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. <sup>12</sup>





## **IV. Propósito del examen**

Esta práctica va encaminada al diagnóstico microbiológico de enterobacterias patógenas que afectan el tracto gastrointestinal. Se utilizarán dos métodos: método tradicional y un método alternativo de diagnóstico (medios cromogénicos y sistema API20), empleando cepas de enterobacterias patógenas, que se considerarán como control de calidad. Con el objetivo de conocer los fundamentos y pasos a seguir de los mismos. Por último y de manera significativa se pretende mejorar el proceso de enseñanza y aprendizaje, así como mejorar la preparación académica de los alumnos que cursan el módulo de laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas. Los alumnos tendrán los conocimientos básicos teóricos y prácticos necesarios para cada una de las etapas de control de calidad de la práctica.

## **V. Metodología**

Se utilizarán dos métodos: método tradicional y el método alternativo de diagnóstico (sistema API20 y medios cromogénicos). Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

En esta primera sección de la metodología se hará mención de la fase preanalítica. La fase preanalítica es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma.

### **V.I. Fase Preanalítica**

#### **INDICACIONES Y PRECAUCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA**

Para detectar patógenos entéricos en el laboratorio es indispensable que se cumpla con las pautas apropiadas para la recolección y el transporte de la muestra. Se debe indicar al paciente las siguientes condiciones previas para la toma de muestra.



- 1) Primera muestra de heces de la mañana, se recogerá en un recipiente de plástico de boca ancha con tapa hermética, de preferencia que sea estéril, estos recipientes deberán estar libres de conservantes, detergentes o iones metálicos. Evitar la contaminación con orina y papel higiénico.



- 2) Para la mayoría de los procedimientos el volumen de la muestra de heces líquidas debe ser menor o igual a 5 ml y de 1-2 gramos heces sólidas (del tamaño de una nuez). La muestra debe llevarse al laboratorio antes de 2 horas para su estudio.
- 3) Indicar siempre el diagnóstico presuntivo médico y los datos del paciente.
- 4) Solicitar lo estudios correspondientes explícitamente (*C. difficile*, *Vibrio* spp., *E. coli* enterohemorrágico (O157: H7), etc.), acompañada de datos clínicos y epidemiológicos (Si con la primera muestra no se detecta la presencia de enteropatógenos, es necesario enviar en los días siguientes, dos muestras consecutivas adicionales).<sup>(6)</sup>



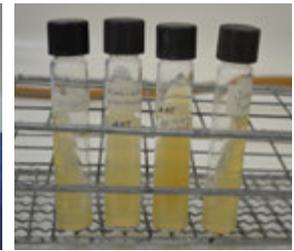
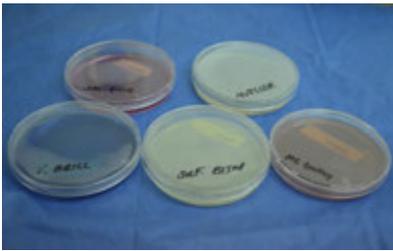


Antes y después de cada procedimiento Utilizar guantes de látex y cubrebocas.  
lavarse las manos correctamente.



### EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REACTIVOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS
Bata Asa bacteriológica Portaobjetos Cubreobjetos Guantes Cubrebocas Mechero Fisher Gradilla	Colorantes para tinción de Gram: Cristal violeta Lugol Alcohol-Cetona Safranina	Agar McConkey Agar Salmonella-Shigella Agar Sulfito Bismuto Agar Verde brillante	Citrato de Simmon's Fenilalanina desaminasa LIA MIO SIM TSI Urea de Christensen Caldo nitrato Caldo RM-VP Rojo de fenol + CHO's Lactosa Trehalosa Manitol O/F Hugh Leifson + maltosa con/sin sello de nujol	Fenilalanina desaminasa Indol Caldo nitrato RM-VP
				<b>CEPAS</b>
				<i>E. coli</i> <i>S. typhi</i> <i>S. sonnei</i> <i>K. pneumoniae</i>



### PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA

Se deben seguir las indicaciones establecidas para la recolección de la muestra, tal como se mencionó en las indicaciones y precauciones para la toma de muestra, de igual manera se deben tomar en cuenta los siguientes puntos:

### TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

- Si el procesamiento se retrasa más de dos horas para la realización de los cultivos bacterianos, se debe mantener en refrigeración a 4 °C para evitar el sobrecrecimiento de la microbiota que puede enmascarar o destruir a los enteropatógenos.
- También se puede utilizar un medio de transporte. El medio de transporte de Cary-Blair mantiene en forma óptima la viabilidad de los patógenos bacterianos intestinales, incluidos *Campylobacter* y especies de *Vibrio* (Algunos fabricantes producen un frasco en una ampolla pequeña con medio de Cary-Blair y una cuchara de plástico en su interior adecuada para la recolección de las muestras).



- Como las especies de *Shigella* son frágiles, un medio de transporte constituido por partes iguales de glicerol y amortiguador fosfato 0.033M (pH 7.0) favorece la viabilidad de *Shigella* mejor que el medio de Cary-Blair. Para este propósito el mantenimiento en el medio de transporte con glicerol a temperaturas bajas en refrigeración o congelador brinda mejores resultados.
- Si no se dispone de heces, es posible usar un hisopo rectal, en particular en recién nacidos y en adultos severamente debilitados. Si se sospecha de una infección por *Campylobacter* el hisopo debe colocarse de inmediato en el medio de transporte de Cary-Blair para evitar la desecación.



## V.2. Fase Analítica

En esta fase se describen los métodos: tradicional (A) y el método alternativo de diagnóstico (B), los cuales son explicados a manera de resumen en la siguiente tabla (tabla 2), mostrando el procedimiento a seguir para el diagnóstico microbiológico a partir de muestra clínica o partiendo de cepas de microorganismos. Posteriormente ambos métodos (A y B) serán detallados de forma clara, precisa y sencilla.



**TABLA 2.** Procedimiento del método: tradicional y método alternativo de diagnóstico.

<b>(A) Método tradicional</b>		<b>(B) Método alternativo de diagnóstico</b>	
<b>Origen de la muestra a analizar</b>		<b>Origen de la muestra a analizar</b>	
<b>Cepas</b>	<b>Muestra clínica</b>	<b>Cepas</b>	<b>Muestra clínica</b>
<p><b>Realizar las siguientes actividades:</b></p> <p><b>1.- Examen macroscópico:</b> aspecto, color, consistencia, etc.</p> <p><b>2.- Examen microscópico:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Examen en fresco</li> <li>-Tinción de Gram</li> </ul> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Inocular en medios selectivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>McConkey</b></li> <li>• <b>S-S</b></li> <li>• <b>SB</b></li> <li>• <b>VB</b></li> </ul> <p>Incubar placas a 37 °C, 24-48 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Describir morfología colonial de cada uno de los medios inoculados.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Realizar tinción de Gram.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Examen microscópico utilizando objetivos 40X y 100X.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Identificación de bacterias mediante pruebas bioquímicas.</p>		<p><b>Realizar las siguientes actividades:</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Manejo de medios cromogénicos</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 24 hrs.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>En caso de resultado negativo a las 24 hrs, incubar nuevamente durante 24 hrs.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Observar colonias después de la incubación.</p> <p style="text-align: center;"><b>Manejo del sistema API20E:</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>A partir de una colonia aislada, realizar una suspensión en 5 ml de agua estéril. tubos, no la cúpula.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Llenar la cúpula de los pocillos CIT, VP, GEL.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S para obtener anaerobiosis.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Colocar agua en panal de pocillos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	



<b>(A) Método tradicional</b>		<b>(B) Método alternativo de diagnóstico</b>	
<b>Origen de la muestra a analizar</b>		<b>Origen de la muestra a analizar</b>	
<b>Cepas</b>	<b>Muestra clínica</b>	<b>Cepas</b>	<b>Muestra clínica</b>
		<p>Llenar con la suspensión de bacterias los</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cerrar las cámaras de incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar a 37 °C durante 18-24 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, determinadas pruebas requieren ser reveladas. Tomando en cuenta el siguiente criterio: Si la glucosa es positiva y/o tres o más test son positivos se revelan los test que requieren reactivos:</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>-TDA: añadir una gota de FeCl<sub>3</sub> 10%</p> <p>-VP: añadir una gota del reactivo 1 (KOH al 40%) y una gota del reactivo 2 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH).</p> <p>-IND: añadir una gota de reactivo de Kovacs o dimetilamino-cinamaldehído.</p> <p>-Oxidasa: es la prueba número 21 y se realiza de forma independiente a la tira. Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo (con las tablas de lectura que proporciona el proveedor).</p>	



## **A) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO TRADICIONAL**

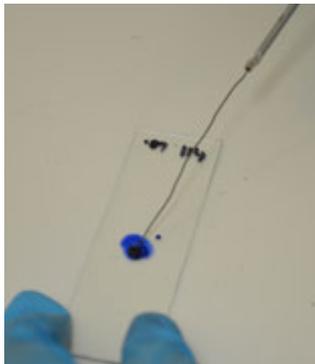
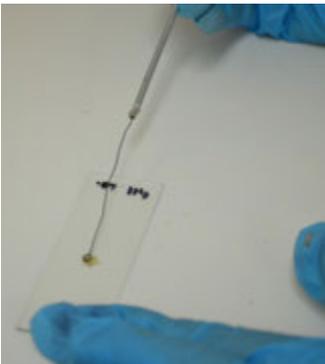
- 1)** Realizar un examen macroscópico a la muestra, observando su aspecto, color, consistencia, entre otros.



- 2)** Realizar un examen microscópico: examen en fresco y tinción de Gram.

### **2.1) EXAMEN EN FRESCO**

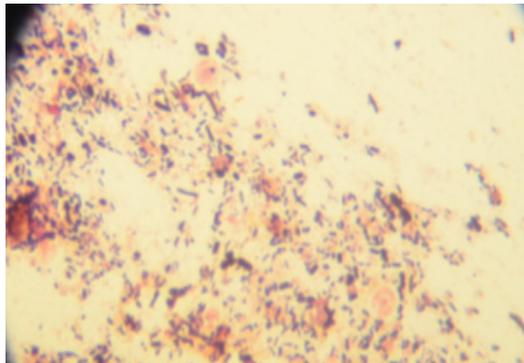
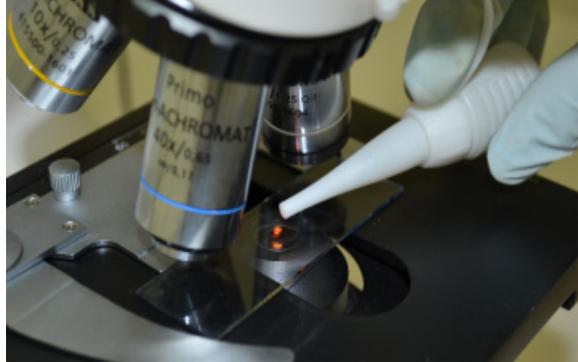
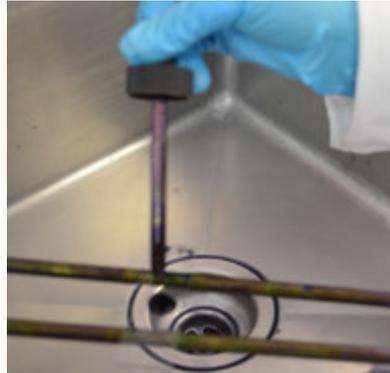
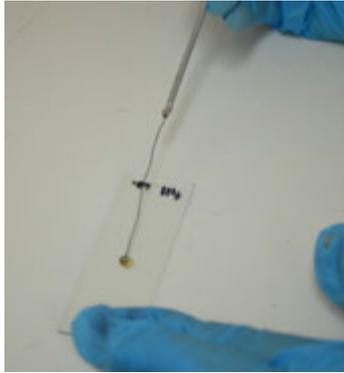
Se toma con el asa bacteriológica una pequeña cantidad de un área con sangre o moco y con el agregado de una porción igual de azul de metileno, es útil para la detección de leucocitos, que en ocasiones ayudan a diferenciar entre los diversos tipos de síndromes diarreicos. Observar la preparación en el microscopio, utilizando objetivos 10X y 40X.





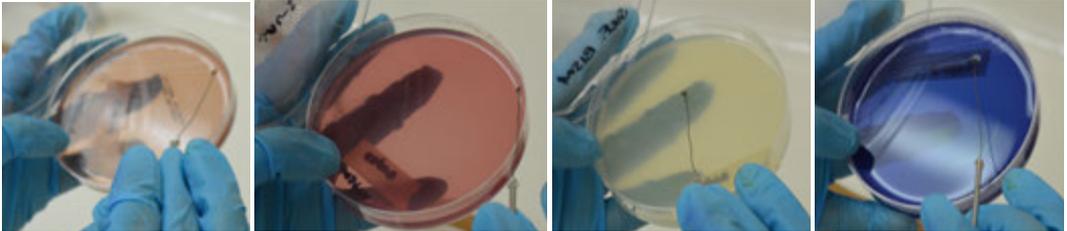
## **2.1) TINCIÓN DE GRAM**

Tomar una pequeña porción de muestra y colocarla en un portaobjetos, posteriormente teñir con la técnica de Gram para la detección de algunos agentes etiológicos y además para detectar leucocitos polimorfonucleares. Observar la preparación en el microscopio, utilizando objetivos 10X y 40X.





- 3) Inocular la cepa del microorganismo o la muestra de materia fecal (preferentemente material mucoso, purulento o sanguinolento) directamente en los medios de cultivo: McConkey, S-S, SB, VB por estría cruzada.



- 4) Incubar las placas a 37 °C durante 24 horas.



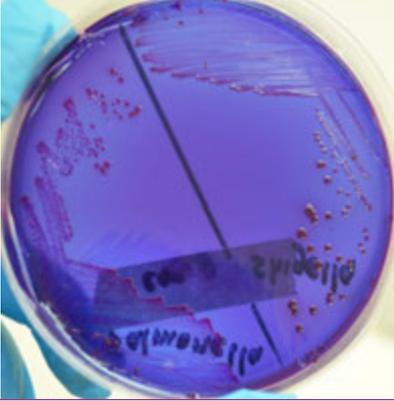


- 5) Observar las características más relevantes de la morfología colonial en cada uno de los medios inoculados, a fin de seleccionar el crecimiento del posible patógeno.

**Cepas inoculadas en:**

*S. typhi*

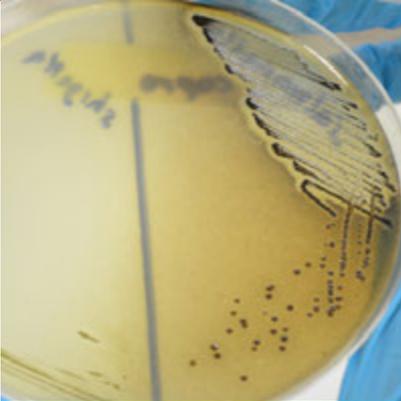
*S. sonnei*



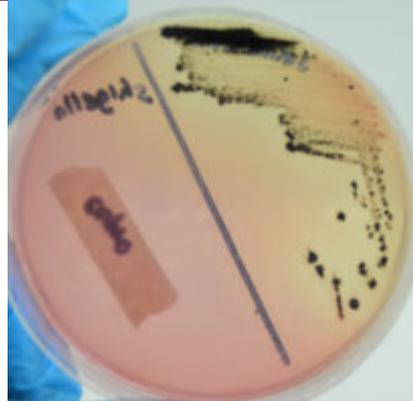
**1-agar VB**



**2-agar McConkey**



**3-agar SB**

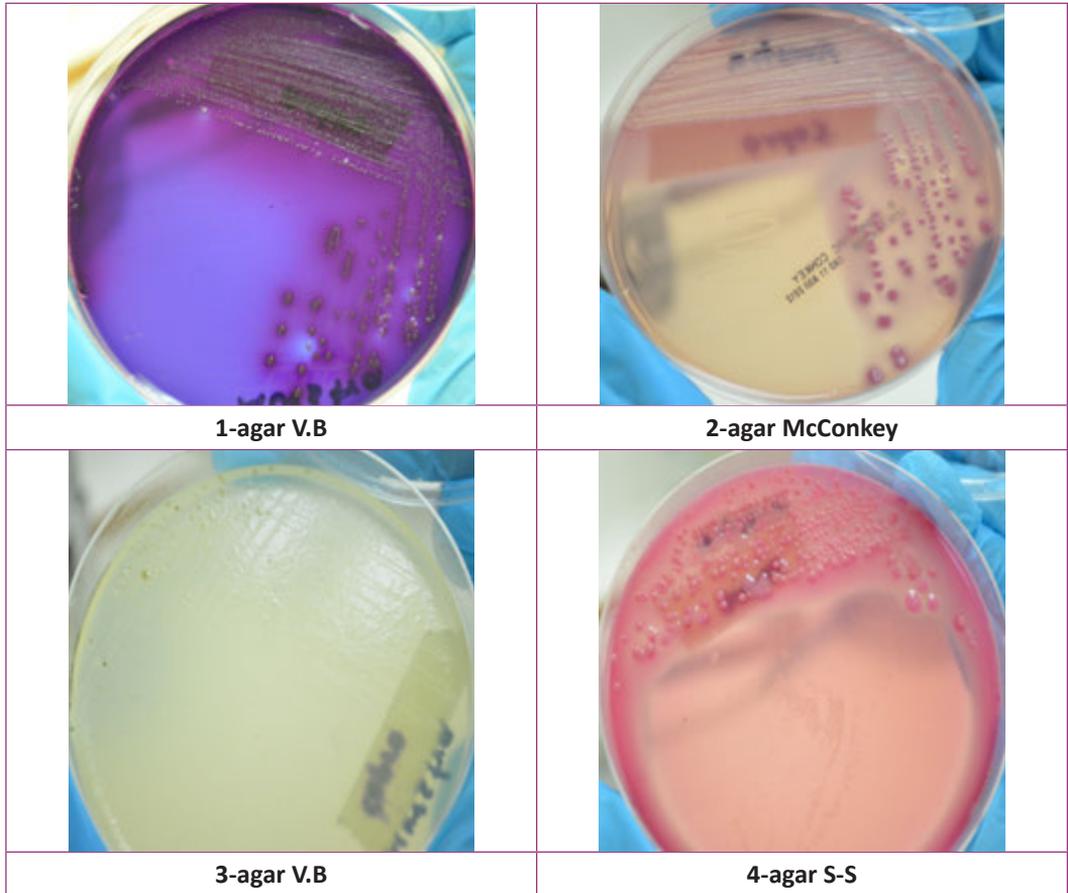


**4-agar SS**

**Crecimiento a las 24 horas.**



Muestra biológica inoculada en:



Crecimiento a las 24 horas.



Cepas inoculadas en:

*K. pneumoniae*

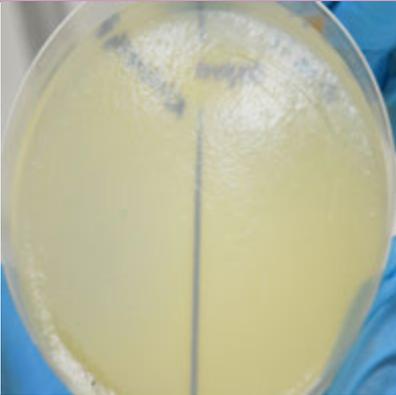
*E. coli*



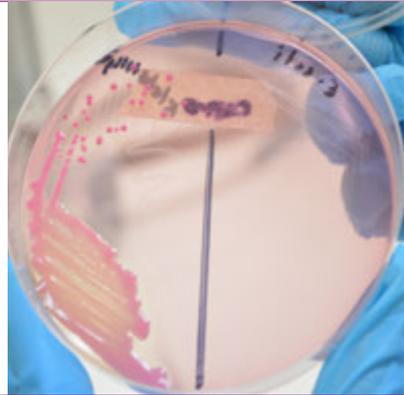
agar VB



agar McConkey



agar SB

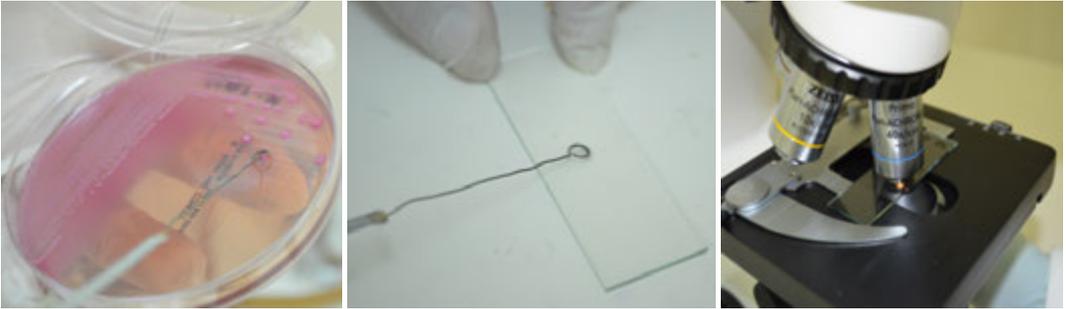


agar SS

Crecimiento a las 24 horas.



- 6) Realizar tinción de Gram de todos los medios inoculados. Observar la preparación en el microscopio, utilizando objetivos 10X y 40X.



- 7) Realizar la inoculación a las pruebas bioquímicas, a partir de colonias bien aisladas de los medios de cultivo utilizados, de acuerdo al criterio y resultado sugerente al tipo de microorganismo aislado en los mismos.



- 8) Reportar todos los resultados en los formatos, para tinción, morfología colonial, pruebas bioquímicas y pruebas especiales. **(ANEXO I)**
- 9) Realizar una discusión de los resultados y conclusiones, con ayuda de la tabla de identificación de pruebas bioquímicas. **(ANEXO I)**



## B) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO MEDIOS CROMOGENICOS

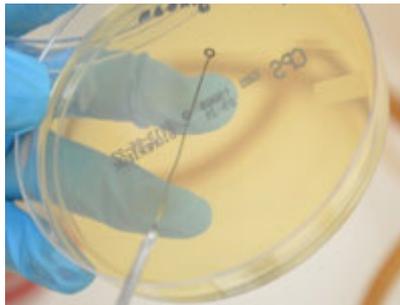
### METODOLOGÍA

Material	Reactivos	Medios de cultivo
<ul style="list-style-type: none"><li>• Asa bacteriológica</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	-----	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agar cromogénico para <i>Salmonella</i></li><li>• Agar cromogénico CPS ID</li></ul>

- 1) Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio cromogénico (Salmonella ID y CPS ID). Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa.



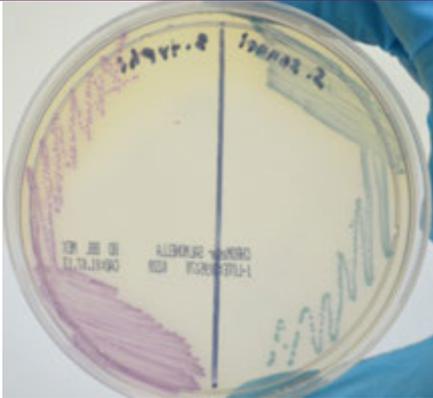
- 2) Incubar las placas en atmósfera aerobia a  $35 \pm 2$  °C durante 24 hrs en posición invertida. En caso de resultado negativo a las 24 hrs, incubar nuevamente durante 24 hrs más para registrar los resultados finales.



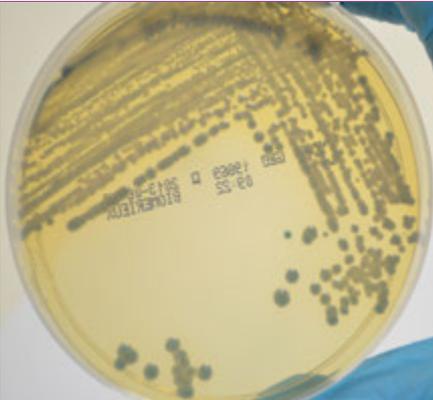


- 3) Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella, ya que la luz puede destruir los cromógenos.
- 4) Una vez que los colores de las colonias se hayan desarrollado, el agar se puede exponer a la luz.
- 5) Anotar el resultado correspondiente en el formato de reporte de resultados. (ANEXO II)

**Cepas inoculadas en:**



**agar cromogénico Salmonella ID**



**agar cromogénico CPS**

**Crecimiento a las 24 horas.**



### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Identificación inmediata y directa de los microorganismos más habituales tras 18-24 horas de incubación:

El medio cromogénico para Salmonella permite la detección de los serotipos typhi, paratyphi y la mayoría de Salmonella Lactosa +.



Detección específica de la actividad enzimática de esterasa: colonias de color rosa claro o malva son Salmonella.



Diferenciación de otras bacterias: colonias de un color diferente.



Inhibición de bacterias grampositivas y levaduras.

**En el medio cromogénico CPS permite la detección de:**



*K. pneumoniae*: colonias verdes



*P. aeruginosa*: colonias pigmentadas (marrón-amarillas)



*E. coli*: colonias rosas-borgoña



*P. mirabilis*: colonias café claro



*Staphylococcus aureus*: colonias amarillas



*Candida albicans*: colonias blancas



*Streptococcus agalactiae*: colonias violetas



Enterococos: colonias turquesas



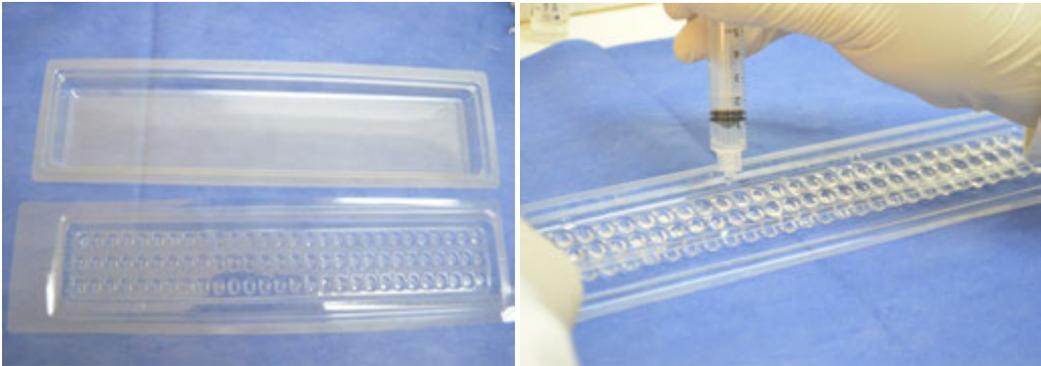
**API 20E**

**METODOLOGÍA**

Material	Reactivos para revelado de pruebas bioquímicas	Medios de cultivo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropipeta</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FeCl<sub>3</sub> 10% (TDA)</li> <li>• KOH al 40% (VP1)</li> <li>• Naftol (VP2)</li> <li>• Kovacs o dimetilamino-cinamaldehído o reactivo de James.</li> <li>• Tetrafenilendiamina</li> <li>• NIT 1 y NIT 2</li> <li>• Zn</li> </ul>	<p style="text-align: center;">-----</p>

**PREPARACIÓN DE LA TIRA**

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.





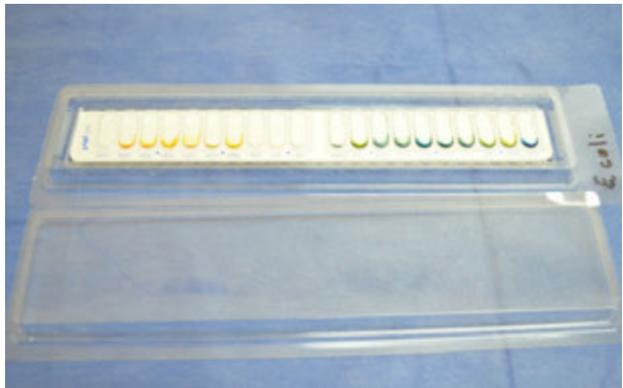
- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).



- 3) Sacar una galería API 20E de su envase individual.



- 4) Colocar la galería en la cámara de incubación.





### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 5) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Médium (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Médium (5 ml) o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.



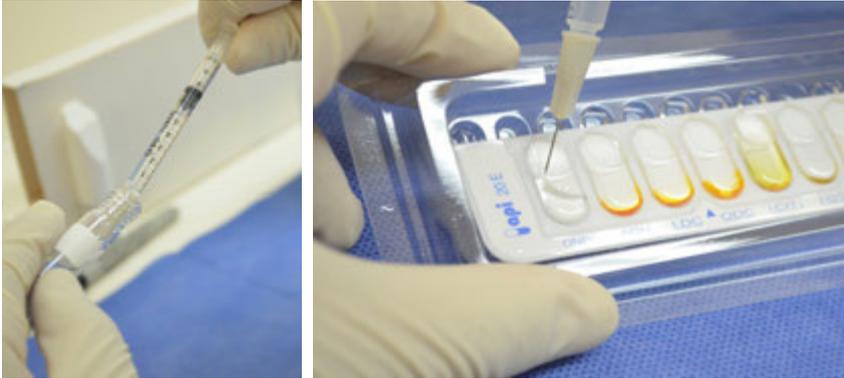
- 6) A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, hacer una suspensión en 5 ml de solución salina (0.85% de NaCl) o 5 ml de agua estéril. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).





## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 7) Con la ayuda de la micropipeta, introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos), colocar la punta de la micropipeta sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia delante.



- 8) Llenar el tubo y la cúpula de los pocillos CIT\*, VP\*, GEL\* con la suspensión de bacterias evitando la formación de burbujas y apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula. Cada cúpula se llena hasta obtener un nivel horizontal o ligeramente convexo, nunca cóncavo para generar resultados correctos.



\*CIT= utilización del citrato

\*VP= producción de acetoina (Voges Proskauer)

\*GEL= gelatinasa (gelatina)



- 9) Para las otras pruebas, llenar únicamente los tubos (no las cúpulas).



- 10) Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos de las pruebas ADH\*, LDC\*, ODC\*, URE\*, H<sub>2</sub>S\* para obtener anaerobiosis.



- \*ADH= Arginina-dihidrolasa    \*URE= Ureasa  
\*LDC=Lisina Decarboxilasa    \*H<sub>2</sub>S= Producción de H<sub>2</sub>S  
\*ODC=Ornitina Decarboxilasa

- 11) Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación y cerrar las cámaras de incubación.





- 12) Incubar a 37 °C durante 18-24 horas.



### LECTURA E INTERPRETACIÓN

- 13) Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO II)



- 14) Determinadas pruebas requieren ser reveladas, para el revelado se tienen que tener en cuenta dos criterios:

- 1. Si la glucosa da negativo y los test positivos son dos o menos de dos, no hay que añadir reactivos.
- 2. Si la glucosa es positiva y/o tres o más test son positivos se revelan los test que requieren reactivos:



**TDA:** añadir una gota de  $\text{FeCl}_3$  10%  
(una gota del reactivo TDA)

Positivo= color marrón oscuro.



**VP:** añadir una gota del reactivo VP1  
y una gota del reactivo VP2

Positivo = color rosa fuerte o rojo  
en 5-10 minutos.

Negativo = color rosa débil  
después de los 10 minutos.





**IND:** añadir una gota de reactivo de Kovacs<sup>1</sup> o dimetilamino-cinamaldehído<sup>2</sup>. O reactivo de James<sup>3</sup> Dependiendo del reactivo utilizado pueden darse las posibilidades siguientes:

<sup>1</sup>Positivo= aparece un anillo rosa-rojo.

<sup>2</sup>Positivo= color de rosa a morado en todo el pocillo.

<sup>3</sup>Positivo= rosa

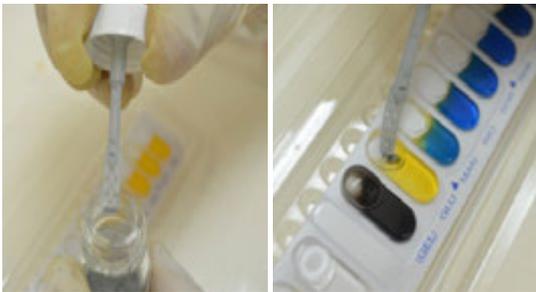


**Reducción de los nitratos en nitritos (NO<sub>2</sub>) y en nitrógeno (N<sub>2</sub>):** añadir una gota de los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos.

Positivo (NO<sub>2</sub>)= coloración roja

Negativo= coloración amarilla, puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de micro-burbujas): agregar de 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula GLU. Después de 5 minutos, si el color sigue siendo **amarillo**, indica una reacción **positiva** (N<sub>2</sub>)

Negativo= coloración naranja-rojizo de la cúpula, ya que los nitratos aún presentes en el tubo han sido reducidos a nitritos por el Zinc.



**Oxidasa:** es la prueba número 21 y se realiza de forma independiente a la tira. Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

Positivo= color azul que aparece inmediatamente.



**15)** Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa).

Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 o 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

-  Si la reacción es negativa se pone 0.
-  Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo, 4 si es el tercero.
-  Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata. <sup>(8, 9, 10)</sup>



**16)** Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato. **(ANEXO II)**

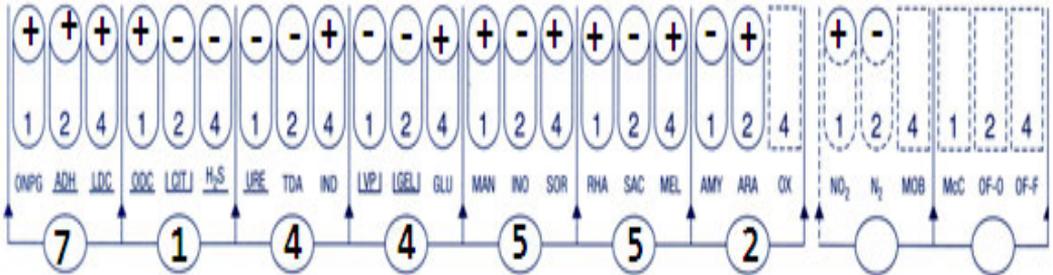
 <p>ONPG ADH LDC</p> <p>ONP GADH LDC</p>	 <p>ODC CIT H2S</p> <p>ODC CIT H2S</p>	 <p>URE TDA IND</p> <p>URE TDA IND</p>
 <p>VP GEL GLU</p> <p>VP GEL GLU</p>	 <p>MAN INO SOR</p> <p>MAN INO SOR</p>	 <p>RHA SAC MEL</p> <p>RHA SAC MEL</p>



AMY ARA OX NO2 N2

PERFIL NUMÉRICO DE 7 CIFRAS: 7144552

IDENTIFICACIÓN:





## SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

### METODOLOGÍA

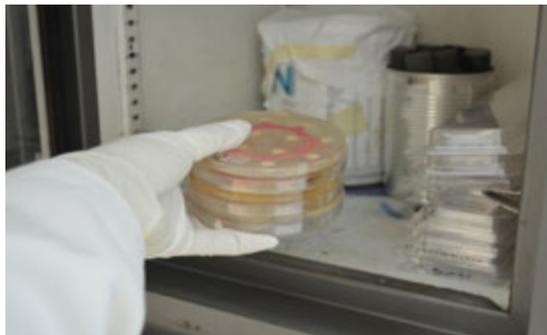
### EQUIPO Y REACTIVOS

Material	Reactivos	Medios de cultivo
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Cubreobjetos</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Mechero</li> </ul>	<p>-----</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Müller Hinton</li> </ul>

- 1) En una placa de MH inocular en todo el medio el microorganismo identificado, a partir de una colonia perfectamente aislada.

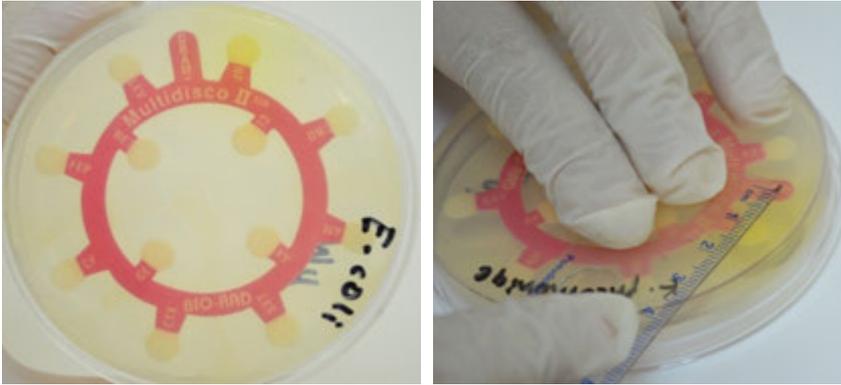


- 2) Incubar la placa a 35 °C por 24 horas.





- 3) Realizar la lectura del antibiograma, utilizando la hoja para susceptibilidad a antibióticos suministrada por el proveedor.<sup>(11)</sup> (ANEXO III)



- 4) Anotar los resultados en el formato de resultados (ANEXO III). Se colocará el nombre del microorganismo patógeno identificado, así como la susceptibilidad a antibióticos en el formato de resultados: informe del laboratorio. (ANEXO IV)

### V.3. Fase Postanalítica

En la fase postanalítica se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de las fases preanalítica y analítica. Los resultados se deben de entregar en un informe que sea legible y fácil de comprender: informe de laboratorio. (ANEXO IV)

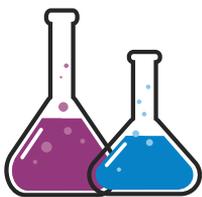
De igual manera se debe reportar la susceptibilidad a antibióticos del microorganismo identificado, para ello se realizará el antibiograma, siguiendo los criterios establecidos por el proveedor.



## **VI. Referencias**

1. Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B. Guerra H. Microbiología mecanismos de las enfermedades infecciosas. Enfoque mediante resolución de problemas. 2ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1994.
2. Spicer W. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. Texto y atlas en color. 2ª ed. Barcelona: Elsevier; 2009
3. Brooks G., Carrol K., Butel J. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 26ª ed. México D.F: McGrawHill Interamericana; 2014.
4. Ingraham J., Ingraham C. Introducción a la microbiología. Volumen I. Barcelona: Reverte; 1998.
5. Manual de bioseguridad en el laboratorio, 3ª ed. [en línea]. Ginebra: Organización mundial de la salud. 2005. [fecha de acceso 5 de mayo de 2021]. URL disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
6. Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico. 12ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009
7. Catálogo de medios de cultivo. [internet]. Francia: Biomérieux. 2010. [fecha de acceso 5 de mayo 2021]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/degarden/biomrieux-catalogo-de-placas-y-medios-de-cultivo>
8. Procop G., Koneman E., Churchill D., Hall G., Janda W., Woods G., Schreckenberger P. Koneman Diagnóstico microbiológico texto y atlas color. 7ª ed. Madrid: Wolters Klumer; 2017.
9. API20 E. Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes. 2009. [en línea]. Francia: Biomérieux. [fecha de acceso 5 de mayo 2021]. Disponible en: [https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/10201/mod\\_resource/content/1/API%2020%20E.pdf](https://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/10201/mod_resource/content/1/API%2020%20E.pdf)
10. Prats G. Microbiología Clínica. Madrid: Médica Panamericana; 2006.
11. Discos para comprobar la susceptibilidad a los antibióticos. [internet]. Francia: BIO- RAD. 2011. [fecha de acceso 5 de mayo 2021]. Disponible en: [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/Literature/inserts/66098\\_01\\_2011\\_ES.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/Literature/inserts/66098_01_2011_ES.pdf)
12. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 ([jalisco.gob.mx](http://jalisco.gob.mx))





# Unidad Aparato respiratorio

## PRÁCTICA 3

### Diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio superior mediante el exudado ótico



**Elaborado por:**

Q.F.B. Angélica Ramón Olivera

Q.F.B. Sthefany Liliana Ortega Cortés

Dr. Roberto Cruz González Meléndez



# Índice

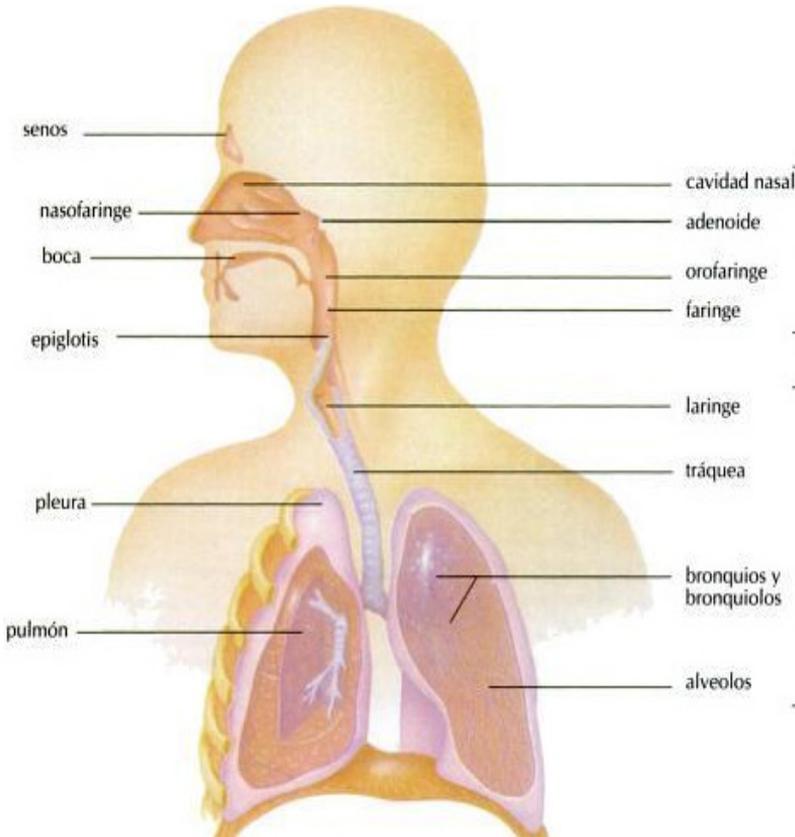
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>117</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>122</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>122</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>126</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>126</b>
V.1 Fase Preanalítica	126
V.2. Fase Analítica	132
V.3. Fase Postanalítica	149
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>149</b>



## I. Introducción

El sistema respiratorio está constituido por un conjunto de órganos cuya función es la de conducir el oxígeno hasta los glóbulos rojos de la sangre. Estos órganos pueden agruparse en dos categorías:

- Las vías respiratorias superiores (la boca, la cavidad nasal, la faringe y la laringe, además del oído medio y externo).
- Las vías respiratorias inferiores (la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los alveolos pulmonares) (**Figura 1**).<sup>(1,2)</sup>



**FIGURA 1.** Anatomía del sistema respiratorio.<sup>(3)</sup>



Las vías respiratorias superiores se encuentran alojadas en la cara y en la parte superior del cuello, y las vías inferiores en la parte inferior del cuello y en el interior del tórax. <sup>(1)</sup>

El tracto respiratorio superior está colonizado por muchos microorganismos, la mayoría considerados parte de la biota normal. Pero también podemos encontrar microorganismos potencialmente patógenos como son: *Estreptococos* grupo A ( $\beta$ -hemolíticos), *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Klebsiella*, *Bacteroides*, *Enterobacterias*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Bordetella pertussis*. Siendo de esta forma las bacterias los patógenos más virulentos de las vías respiratorias superiores, aunque la mayoría de las infecciones que causan pueden ser prevenidas o tratadas eficazmente. Cabe mencionar que estos microorganismos patógenos pueden estar presentes en la biota normal y no ser la principal causa de la infección. <sup>(3, 4, 5)</sup>



La mayor parte de las infecciones del oído se pueden asociar a infecciones respiratorias mal cuidadas y en niños pequeños son muy comunes por la introducción de objetos extraños; las cuales afectan el conducto auditivo externo (otitis externa) o la porción media del oído (otitis media), en la cual se encuentran los huesecillos y están rodeadas por estructuras óseas y por la membrana timpánica. <sup>(5, 6)</sup>



El oído medio y los senos paranasales se comunican con la vía aérea superior por medio de conductos. Las infecciones, causadas principalmente por virus y bacterias, se producen cuando los patógenos que se encuentran en la nariz y la garganta acceden a los oídos o los senos que suelen ser estériles. <sup>(4)</sup>

La otitis se manifiesta por la secreción de un exudado seroso o purulento (otorrea), otalgia y pérdida de audición, principalmente; puede haber fiebre y rotura de la membrana si la presión del fluido es intensa (perforación timpánica). <sup>(8)</sup>

La otitis externa se debe a un fallo de los mecanismos defensivos locales (integridad del epitelio, pH y cerumen) por alteración a causa de factores ambientales (calor o humedad) o microtraumatismos (rascado). Los problemas específicos relacionados con dicha infección se deben a la presencia de un conducto estrecho en el que los líquidos y cuerpos extraños pueden entrar y quedar atrapados, provocando irritación y maceración de los tejidos superficiales; el dolor y el prurito se debe al escaso espacio disponible para la expansión de los tejidos inflamados además de manifestarse con exudado purulento. En ocasiones la otitis externa ocurre como una extensión de la infección del oído medio, con secreción purulenta a través de una membrana timpánica perforada. <sup>(5, 8, 9, 10)</sup>

La otitis externa es similar a una infección de la piel y de los tejidos blandos en cualquier otra parte del cuerpo debido a que posee una biota bacteriana parecida a esta. El medio ambiente húmedo y templado favorece la proliferación de microorganismos saprofitos de esta región que se comportan como patógenos, entre ellos se encuentran microorganismos grampositivos, como *S. aureus*; hongos como *Aspergillus niger* y *Candida albicans*, y bacterias gramnegativas como *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* siendo esta última la más común. <sup>(5, 8, 9, 10, 11)</sup>

La otitis externa puede subdividirse en cuatro categorías:

 **Otitis externa localizada aguda:** puede manifestarse como una lesión pustulosa o un forúnculo con folículos pilosos; es causada por *S. aureus*. Las erisipelas provocadas por los estreptococos del grupo A pueden afectar el pabellón auricular y el conducto auditivo externo. El dolor puede ser severo y a veces se observan ampollas hemorrágicas de un color rojizo azulado en las paredes de la porción ósea del conducto y sobre la membrana timpánica. <sup>(9)</sup>



-  **Otitis externa difusa aguda (oído del nadador):** se observa principalmente en un clima caluroso y húmedo además de asociarse con la natación en aguas que pueden estar contaminados por microorganismos gramnegativos aerobios, es causada principalmente por *P. aeruginosa*. Se caracteriza por prurito del conducto auditivo externo y un dolor creciente. La piel del conducto se encuentra edematosa y eritematosa. <sup>(5, 9)</sup>
-  **Otitis externa crónica:** es consecuencia de la irritación provocada por el drenaje del oído medio en pacientes con una otitis media supurativa crónica. El prurito es intenso. Algunas causas raras de esta consisten en tuberculosis, sífilis, lepra y sarcoides. <sup>(9)</sup>
-  **Otitis externa invasiva (maligna):** es una infección necrotizante severa que se propaga desde el epitelio escamoso del conducto auditivo externo hacia los tejidos blandos, los vasos sanguíneos, el cartílago y el hueso circundantes, en ocasiones produciendo parálisis nerviosa y muerte. Presenta dolor severo e hipersensibilidad de los tejidos vecinos a la oreja. Afecta principalmente a las personas de edad avanzada y a los pacientes diabéticos e inmunocomprometidos. Es causada principalmente por *P. aeruginosa*. <sup>(5,9)</sup>

El exudado ótico está indicado para el diagnóstico de la otitis externa y en ningún caso resulta representativo de los microorganismos existentes en el oído medio. <sup>(8)</sup>

Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Fase preanalítica:** es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma. Se indica los reactivos que serán empleados, y en este caso la correcta manipulación de las cepas puras de microorganismos representativas que afectan al oído.

**Fase analítica:** se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados (en El Manual de Operación y Mantenimiento Preventivo de los Equipos utilizados en el Laboratorio de Bacteriología y



Micología Médicas, se describen las especificaciones y características de estos, sus normas de funcionamiento, calibración, etc.).

En esta práctica se explica el uso de los medios de cultivos selectivos, diferenciales, de transporte, de enriquecimiento, pruebas bioquímicas y pruebas especiales; así como también de los métodos actuales de diagnóstico como el sistema API® 20 y de los medios cromogénicos.

**Fase postanalítica:** se refiere a los resultados obtenidos los cuales se especifican en el informe del laboratorio de forma que sea legible y fácil de comprender. A esta fase se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

El control de calidad es responsabilidad de la persona a cargo del área de microbiología, la cual debe asegurarse de que las pruebas realizadas sean procesadas con calidad y de que los resultados sean confiables, reproducibles y tan exactos como sea posible, siguiendo los procedimientos establecidos. <sup>(12)</sup>

En el presente trabajo se establecen los métodos tradicionales y métodos alternativos (sistema API® 20 y medios cromogénicos) de diagnóstico microbiológico empleados para microorganismos causantes de infecciones del sistema respiratorio que nos permitan el diagnóstico de microorganismos causantes de patologías en los sistemas del cuerpo humano y así tener un mejor conocimiento en cuanto a la identificación de los microorganismos por género y especie.

Cabe señalar que al final del manual se presenta un cuestionario que tiene por objetivo validar la utilidad de esta práctica, y con las opiniones de alumnos y profesores establecer un proceso de mejora continua de esta práctica.



## II. Objetivos

- ✎ Utilizar los procedimientos del método tradicional y alternativo de diagnóstico microbiológico para identificar a los microorganismos patógenos que se encuentran en un exudado ótico.
- ✎ Utilizar el sistema API® 20 y medios cromogénicos como métodos alternativos de diagnóstico.
- ✎ Utilizar cepas de bacterias frecuentemente encontradas en un exudado ótico como control de calidad en los métodos tradicional y alternativo de diagnóstico.

## III. Medidas de bioseguridad

De acuerdo con la publicación de la OMS en 2005, se hace referencia a los peligros relativos que entrañan los microorganismos infecciosos clasificados por grupos de riesgo, la cual se utilizará exclusivamente para el trabajo de laboratorio (**Cuadro 1**).

Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en el tipo de instalaciones (características de diseño, construcción, medios de contención), el equipo a utilizar, las prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con los agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo (Cuadro 2). Por ello el nivel de bioseguridad que tiene el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la FES Zaragoza es de nivel 1 (**Cuadro 2**). De tal forma que existe una relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad y con ello la clasificación del tipo de laboratorio y el equipo de seguridad.

Por ello cada laboratorio debe adoptar un manual de seguridad o de trabajo en el que identifiquen los riesgos conocidos y potenciales, y se especifiquen las prácticas y los procedimientos encaminados a eliminar o reducir al mínimo esos riesgos.



**CUADRO 1.** Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo. <sup>(13)</sup>

<b>Grupo de riesgo 1</b>	Riesgo individual y poblacional escaso o nulo. Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
<b>Grupo de riesgo 2</b>	Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
<b>Grupo de riesgo 3</b>	Riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
<b>Grupo de riesgo 4</b>	Riesgo individual y poblacional elevado. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

**CUADRO 2.** Relación del grupo de riesgo con el nivel de bioseguridad, las prácticas y el equipo de laboratorio. <sup>(13)</sup>

<b>Grupo de riesgo</b>	<b>Nivel de bioseguridad</b>	<b>Tipo de laboratorio</b>	<b>Prácticas de laboratorio</b>	<b>Equipo de seguridad</b>
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación.	Técnicas microbiológicas apropiadas.	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto.



A continuación, se mencionan algunos aspectos importantes en cuanto a las medidas de bioseguridad.

### Protección personal:

- Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio (Figura 3).



**FIGURA 1.** Protección personal.

- Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
- El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
- Se usarán gafas de seguridad u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
- Estará prohibido usar prendas protectoras fuera de laboratorio.



- En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
- La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios que la ropa de calle. <sup>(13)</sup>

#### Zonas de trabajo del laboratorio:

- El laboratorio se mantendrá ordenado y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso, al inicio y al final de cada jornada de trabajo. <sup>(13)</sup>

#### Manipulación de desechos:

Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados deberán ser descontaminados antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a utilizar. <sup>(13)</sup>

- Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. 24





## IV. Propósito del examen

Esta práctica está encaminada al diagnóstico microbiológico de *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias aisladas de un exudado ótico, que según el criterio clínico puedan interpretarse como patógenas.

Se utilizarán dos métodos: método tradicional y método alternativo de diagnóstico (sistema API® 20 y medios cromogénicos), empleando cepas puras de bacterias que se considerarán como control de calidad, con el objetivo de conocer los fundamentos y pasos a seguir de los mismos. De manera que se pretende mejorar el proceso de enseñanza y aprendizaje, así como la preparación académica de los alumnos que cursan el módulo de laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas; ya que estos tendrán los conocimientos teóricos y prácticos necesarios para cada una de las etapas de control de calidad de la práctica.

## V. Metodología

### V.I. Fase Preanalítica

#### INDICACIONES Y PRECAUCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA

Se debe indicar al paciente las siguientes condiciones previas a la toma de muestra.

- 1) No usar gotas óticas de 18 a 24 horas antes de la toma de muestra.
- 2) No tomar o aplicar antibióticos de 24 a 48 horas antes de la toma de muestra.

**NOTA:** si lo anterior no es posible se debe obtener la muestra justo antes de la administración de la dosis.





- 3) No lavar los oídos una noche anterior.
- 4) No se recomienda el cultivo rutinario, sino en aquellos casos crónicos que no responden a la terapia instaurada. <sup>(4, 12, 14)</sup>
- 5) Antes y después de cada procedimiento lavarse las manos correctamente.



- 6) El personal de laboratorio deberá usar bata (a fin de evitar que la ropa de calle se pueda contaminar o ensuciar), guantes y cubrebocas.





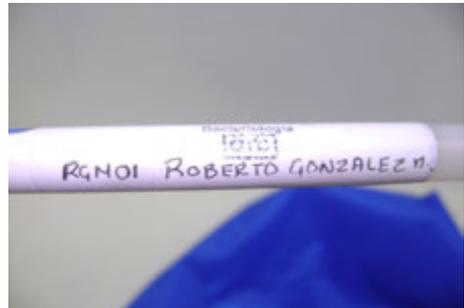
- 7) Tener preparado hisopos y medio de transporte para el Exudado Ótico.



- 8) Tener encendido el mechero pues éste dará el área de esterilidad para realizar la toma de muestra.



- 9) Etiquetar el medio del transporte con los datos del paciente. <sup>(13, 14)</sup>





En el siguiente cuadro se enlistan los materiales que se ocuparán durante esta práctica.

**CUADRO 3.** Material necesario para la práctica del exudado ótico. (4, 6, 8, 12, 13, 14, 15, 16)

MATERIAL	CEPAS	MEDIOS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubreboca</li> <li>• Mechero</li> <li>• Bunsen</li> <li>• Gradilla</li> <li>• Hisopos de algodón</li> <li>• Jeringa</li> <li>• Algodón</li> <li>• Cloruro de benzalconio 1:1000 o solución jabonosa</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Pipeta</li> <li>• Aceite de inmersión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. aeruginosa</i></li> <li>• <i>S. aureus</i></li> <li>• <i>E. coli</i></li> <li>• <i>P. mirabilis</i></li> </ul>	<p>Transporte</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stuar Amies</li> </ul> <p>Cultivo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Sangre de Carnero (ASC) 5%</li> <li>• Agar Chocolate</li> <li>• Agar Sal y Manitol</li> <li>• Agar McConkey</li> <li>• Agar Cetrimida</li> <li>• Agar Sabouraud + Cloranfenicol</li> </ul> <p>Susceptibilidad antibióticos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Müller Hinton</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rojo de Fenol más CHO's:</li> <li>• Lactosa</li> <li>• Maltosa</li> <li>• Sacarosa</li> <li>• Trehalosa</li> <li>• Glucosa</li> <li>• Manitol</li> <li>• Adonitol</li> <li>• Arabinosa</li> <li>• Sorbitol</li> <li>• Inositol</li> <li>• Xilosa</li> <li>• Prueba de catalasa</li> <li>• Prueba de coagulasa</li> <li>• Hugh-Leifson: Manitol con y sin sello</li> <li>• Glucosa con y sin sello</li> <li>• Urea de Christensen</li> <li>• Citrato de Simmons</li> <li>• Caldo Nitrato</li> <li>• Fenilalanina desaminasa</li> <li>• RMVP</li> <li>• SIM</li> <li>• TSI</li> <li>• MIO</li> <li>• LIA</li> </ul>	<p>Tinción de Gram</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristal violeta</li> <li>• Lugol</li> <li>• Alcohol-Cetona</li> <li>• Safranina</li> </ul> <p>Tinción de Flagelos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colorante de Leifson</li> </ul> <p>Prueba de catalasa</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peróxido de hidrógeno</li> </ul> <p>Caldo Nitrato</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido sulfanílico</li> <li>• <math>\alpha</math>-naftilamina</li> </ul> <p>Fenilalanina desaminasa</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloruro férrico</li> </ul> <p>RMVP</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Indicador Rojo de Metilo</li> <li>• KOH 40%</li> <li>• <math>\alpha</math>-naftol</li> </ul> <p>SIM y MIO</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kovacs</li> </ul>



## PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA DEL EXUDADO ÓTICO

1) Informar al paciente sobre el procedimiento a realizar. <sup>(17)</sup>

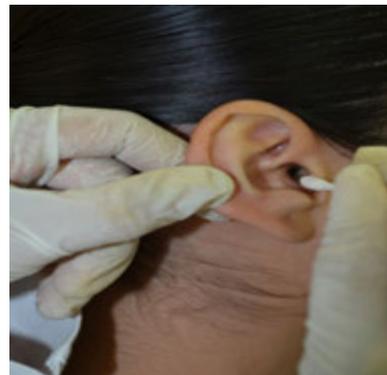
2) Colocar al paciente en una silla ergonómica y bajo una buena fuente de luz.



3) Realizar limpieza de la parte externa del oído con un algodón humedecido con un antiséptico suave (Cloruro de benzalconio 1:1000, solución jabonosa o alcohol 70 %). <sup>(6, 8, 15)</sup>



4) Introducir el hisopo teniendo cuidado de no lastimar (indicando al paciente hasta donde soporta el hisopo), en el caso de abscesos aspirar el fluido con la jeringa.



**NOTA:** Se debe emplear un hisopo para cada oído. <sup>(6, 15, 18)</sup>



- 5) Se obtendrá la muestra frotando el hisopo contra las paredes del conducto auditivo externo. (18)



- 6) Retirar el hisopo con suavidad y ponerlo en el medio de transporte adecuado a la etiología que se sospeche. Utilizar un segundo hisopo para el otro oído y repetir el procedimiento sin olvidar diferenciar las muestras (derecha e izquierda).



**NOTA:** Transportar durante los primeros 15 minutos de la recolección y a temperatura ambiente. Si no se puede trabajar de inmediato la muestra mantener entre 4-10 °C (no exceder de 2 horas). (6, 12, 14, 17, 18)

- 7) Todos los materiales utilizados deberán desecharse de acuerdo a la norma para los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos. (13)





## V.2. Fase Analítica

En esta fase se describen los métodos: tradicional y alternativo de diagnóstico, los cuales son explicados a manera de resumen en el **Cuadro 4**, mostrando el procedimiento a seguir para el diagnóstico microbiológico a partir de la muestra clínica o partiendo de cepas puras. Posteriormente ambos métodos serán detallados de forma clara, precisa y sencilla.

**CUADRO 4.** Procedimiento del método: tradicional y alternativo de diagnóstico. (4, 5, 14, 19)

Método tradicional		Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
<p style="text-align: center;"><b>Cultivo</b></p> <p>De la muestra del exudado ótico para aislamiento en la superficie del medio.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar placas 35-37 °C / 24-48 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Tinción de Gram</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Examen microscópico Objetivo 100X</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pruebas bioquímicas</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Susceptibilidad a antibióticos (Antibiograma)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Identificación de bacterias</p>		<p style="text-align: center;"><b>Sistema API® 20</b></p> <p>Preparación de la galería Colocar 5 ml de agua en el panel de pocillos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Preparación del inóculo A partir de una colonia aislada del microorganismo, preparar una suspensión bacteriana homogénea.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Inoculación de la galería Llenar con la suspensión bacteriana los microtubos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cubrir con parafina las cúpulas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cerrar la cámara de incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar 36 ± 2 °C / 18-24 horas</p>	



Método tradicional		Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
		↓ Lectura de la galería Se da por comparación de los colores con las tablas de lectura: * Se anotan los resultados que no requieren ser revelados. * Posteriormente se agregan los reactivos necesarios para revelar las pruebas. ↓ Interpretación Determinación del perfil numérico	
		<b>Medios cromogénicos</b> ↓ Sembrar muestra En la superficie del medio. ↓ Incubar placas 35-37 °C / 24 horas. <b>NOTA:</b> reducir al mínimo la exposición a la luz antes y durante la incubación. ↓ Observar colonias	



## A) DESCRIPCIÓN MÉTODO TRADICIONAL

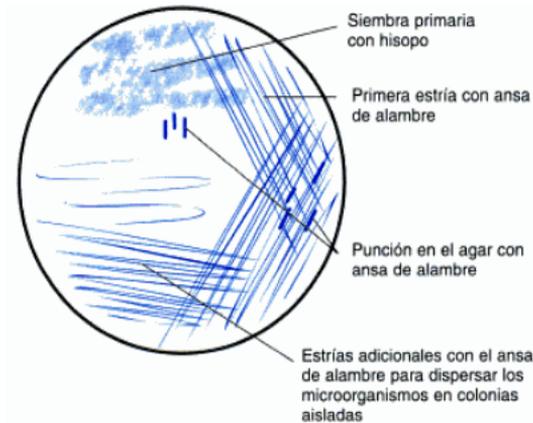
La sospecha clínica de una infección ótica debe confirmarse a través del examen por cultivo y posteriormente microscópico de las colonias aisladas.

### CULTIVO

1) Sembrar la muestra obtenida por estría cruzada (**Figura 4**) en las placas de:

-  ASC 5%
-  Agar Chocolate
-  Agar Sal y Manitol
-  Agar Mac Conkey
-  Agar Cetrimida
-  Agar Sabouraud + cloranfenicol (hongos).

**NOTA:** dividir cada placa de agar en dos, en una mitad sembrar la muestra del oído izquierdo y en la otra la muestra del oído derecho. <sup>(4, 8, 15)</sup>



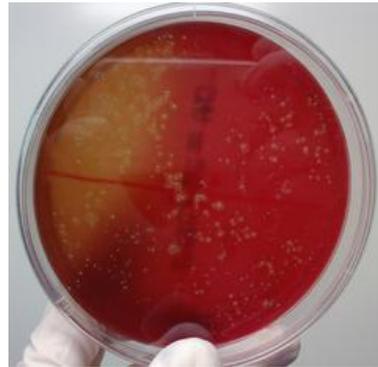
**FIGURA 4.** Técnica de estría, punción y aislamiento de la muestra. <sup>(4)</sup>



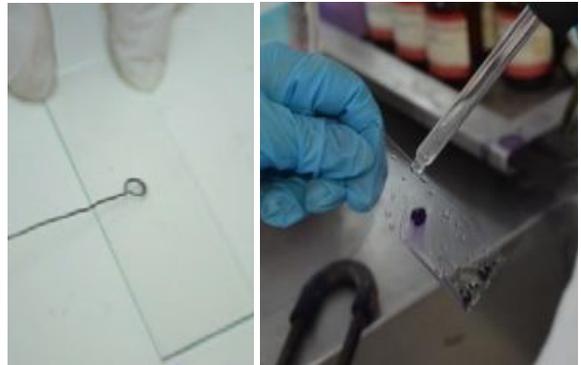
- 2) Incubar 24 a 48 horas a 37 ° C.



- 3) Observar la morfología colonial de las bacterias en cada uno de los medios inoculados, a fin de seleccionar el crecimiento del posible patógeno. <sup>(4, 15)</sup>



- 4) Realizar las preparaciones de las colonias aisladas en cada una de las placas y teñir con la técnica de Gram.





- 5) Observar las preparaciones al microscopio utilizando el objetivo 100X. <sup>(4)</sup>



- 6) Realizar la inoculación de las pruebas bioquímicas seleccionadas a partir de las colonias aisladas del medio de cultivo utilizado, de acuerdo al criterio y resultado sugerente al tipo de microorganismo aislado en los mismos.



- 7) Incubar 24 a 48 horas a 35-37 °C.



- 8) Realizar las lecturas de las pruebas realizadas. <sup>(4)</sup>

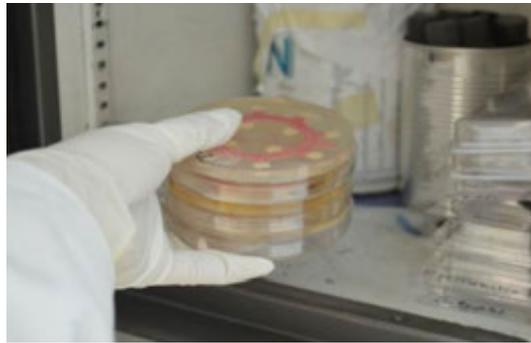


## SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

- 9) Realizar el antibiograma del agente etiológico. En una placa de Agar Müeller Hinton inocular en todo el medio el microorganismo identificado, a partir de una colonia aislada y colocar el multidisco.



- 10) Incubar la placa a 35-37 °C por 24 horas.



- 11) Realizar la lectura del antibiograma, utilizando la hoja para sensibilidad a antibióticos. (ANEXO III) <sup>(4)</sup>
- 12) Reportar todos los resultados en los formatos, para tinción, morfología colonial, pruebas bioquímicas y pruebas especiales. (ANEXO I)
- 13) Realizar la discusión de los resultados y las conclusiones.



## B) DESCRIPCIÓN MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO

### SISTEMA API® 20

- 1) Una vez aislado el agente etiológico a partir del cultivo y la observación al microscopio, inocular el sistema API® 20 correspondiente:

 API® 20 E: *P. aeruginosa*

 API® 20 Staph: *S. aureus*

 API® 20 E: *E. coli*

 API® 20 E: *P. mirabilis*

- 2) Todas las instrucciones para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada uno de los microtubos, y las condiciones de incubación se pueden encontrar claramente especificadas en los instructivos de uso señalados por el fabricante para cada tipo de galería. <sup>(20)</sup>

**NOTA:** A continuación, se describe el procedimiento para el diagnóstico de *P. aeruginosa* como agente etiológico, con base en la guías API 20.

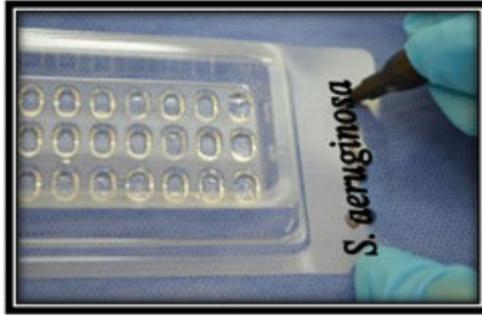
### PREPARACIÓN DE LA GALERÍA

- 3) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.





- 4) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No escribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).



- 5) Sacar una galería API® 20 E de su envase individual y colocar la galería en la cámara de incubación. <sup>(19)</sup>

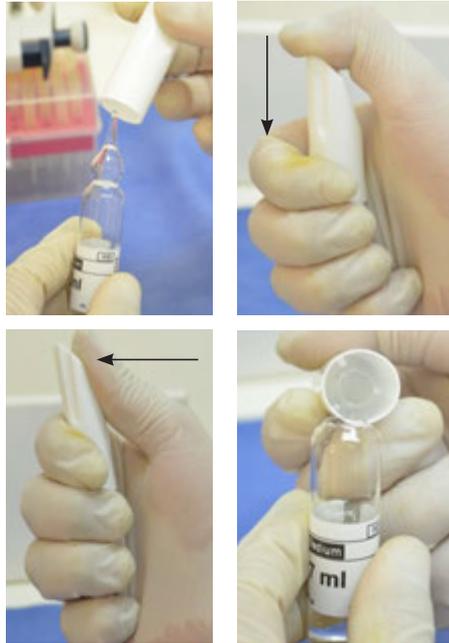


### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 6) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Medium (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Medium (5 ml), o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril sin aditivos:
- Introducir la ampolla en el protector de ampolla (tapón blanco).
  - Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - Presionar a fondo el tapón blanco.
  - Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.



- e) Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
- f) Retirar delicadamente el tapón.



- 7) A partir de la cepa o de una colonia bien aislada del microorganismo, preparar una suspensión bacteriana homogénea en 5 ml de solución salina (0,85% de NaCl) o agua estéril.



**NOTA:** La mayoría de las especies de *Vibrio* son halófilas. En caso de sospechar la presencia de un *Vibrio* realizar la suspensión bacteriana en el API NaCl 0,85% Medium.



- 8) Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación. <sup>(19)</sup>



### INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 9) Con ayuda de una pipeta, introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería. Para evitar la formación de burbujas, inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.



- 10) Llenar el tubo y la cúpula para las pruebas CIT, VP y GEL. Llenar únicamente los tubos (no las cúpulas) para las otras pruebas.



- 11)** Crear anaerobiosis en las pruebas ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE llenando las cúpulas con aceite de parafina para formar un menisco convexo.



- 12)** Cerrar la cámara de incubación.





**13)** Incubar durante 18-24 horas a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . <sup>(19)</sup>



### LECTURA DE LA GALERÍA

- 14)** Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. **(ANEXO II)**
- 15)** Después del periodo de incubación, el desarrollo de las reacciones se dará por la adición de 1 gota de cada uno de los siguientes reactivos y a continuación se interpretan todas las reacciones conforme a la tabla de identificación. **(ANEXO II)**





16) Determinadas pruebas requieren ser reveladas, para el revelado se tienen que tener en cuenta dos criterios:

- Si la glucosa da negativo y los test positivos son dos o menos de dos, no hay que añadir reactivos.
- Si la glucosa es positiva y/o tres o más test son positivos se revelan los test que requieren reactivos:

**TDA:** añadir una gota de  $\text{FeCl}_3$  10% (una gota del reactivo TDA).

Positivo= color marrón oscuro



**VP:** añadir una gota del reactivo VP1 y una gota del reactivo VP2.

Positivo= color rosa fuerte o rojo en 5-10 minutos.

Negativo= color rosa débil después de los 10 minutos.





**IND:** añadir una gota de reactivo de Kovacs<sup>1</sup> o dimetilamino-cinamaldehído <sup>2</sup>. O reactivo de James <sup>3</sup> dependiendo del reactivo utilizado pueden darse las posibilidades siguientes:

<sup>1</sup>Positivo= aparece un anillo rosa-rojo.

<sup>2</sup>Positivo= color de rosa a morado en todo el pocillo.

<sup>3</sup>Positivo= rosa



Reducción de los nitratos en nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y en nitrógeno ( $\text{N}_2$ ): añadir una gota de los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos.

Positivo ( $\text{NO}_2$ )= coloración roja



Negativo= coloración amarilla, puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de micro-burbujas): agregar de 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula GLU. Después de 5 minutos, si el color sigue siendo **amarillo**, indica una reacción **positiva** ( $\text{N}_2$ )

Negativo= coloración naranja-rojizo de la cúpula, ya que los nitratos aún presentes en el tubo han sido reducidos a nitritos por el Zinc.



**NOTA:** La prueba de Indol y Nitratos deben realizarse en último lugar, ya que liberan gases que pueden alterar la interpretación de otras pruebas. No colocar la tapa después de agregar los reactivos. <sup>(19)</sup>

**17)** Reportar en el formato los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos. (ANEXO II)





## MEDIOS CROMOGENICOS

Una vez identificado el agente etiológico inocular el medio cromogénico correspondiente:

-  chromID™ *P. aeruginosa*: *P. aeruginosa*
-  chromID™ *S. aureus*: *S. aureus*
-  chromID™ ESBL: *E. coli*  
*P. mirabilis*



- 1) Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña cercana al borde para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa.



- 2) Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35-37 °C durante 24 horas en posición invertida. En caso de resultado negativo a las 24 horas, incubar nuevamente durante 24 horas más para registrar los resultados finales.



**NOTA:** Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella, ya que la luz puede destruir los cromógenos. <sup>(4, 21)</sup>

- 3) Una vez que los colores de las colonias se hayan desarrollado, el agar cromogénico se puede exponer a la luz, para efectuar la lectura de las placas contra un fondo blanco.
- 4) Anotar el resultado correspondiente en el formato de reporte de resultados. **(ANEXO II)**
- 5) El medio cromogénico chromID™ *P. aeruginosa* permite la detección de:

 *P. aeruginosa*: colonias de color rosa-violeta (**Figura 5**), específicas de las colonias productoras de aminopeptidasa.



**FIGURA 5.** Placa de Agar PAID en donde se puede observar la identificación de *P. aeruginosa* (colonias rosa-violeta). (21)



- 6) El medio cromogénico chromID™ *S. aureus* permite la detección de:
-  *S. aureus*: colonias de color verde, de las colonias productoras de glucosidasa.
  -  *S. epidermidis*: colonias de color blancas.
  -  *S. saprophyticus*: colonias de color rosas.
  -  *S. xylosus*: colonias de color malva.
- 7) El medio cromogénico chromID™ ESBL permite la detección de bacterias productoras de  $\beta$ -Lactamasa de espectro extendido:
-  *E. coli*: colonias de color rosa a burdeos, de cepas productoras de  $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ -GUR).
  -  *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*: colonias de color marrón oscuro a marrón claro de cepas que expresan una desaminasa.
  -  *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC): colonias de color verde, marrón verdoso o azul de cepas que expresan  $\beta$ -glucuronidasa ( $\beta$ -GUR). <sup>(21)</sup>

## VI.1 Fase Postanalítica

Se refiere a los resultados obtenidos, los cuales se especifican en el informe de laboratorio de forma que sea legible y fácil de comprender. (ANEXO IV) <sup>(12)</sup>

## VI. Referencias

- Rodríguez PM. Anatomía, Fisiología e Higiene. 2ª ed. México: Edelveive; 2016.
- Universidad Nacional Autónoma de México. Exudado Faríngeo. 2016. Recuperado a partir de: <http://procedimientosmicrobiologicos.wikispaces.com/EXUDADO+FAR%C3%8DNGEO>

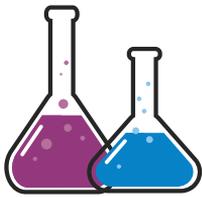


3. Ingraham JL, Ingraham C. Introducción a la microbiología. Vol. II. Barcelona: Reverte; 1998.
4. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop P., Schreckenberger P., Woods G. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. 6 ed. Médica Panamericana: Buenos Aires; 2008.
5. Ryan KJ, Ray CG. Sherris. Microbiología médica. 6 ed. México DF: Mc Graw Hill; 2017.
6. Escobedo López AB, Cabrera Maldonado C, Álvarez López JM, Pazos Salazar NJ, Suárez Albores PG, Pérez Fernández MS. Manual de Bacteriología II. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: México; 2002. Recuperado a partir de: [http://www.facultadcienciasquimicas.buap.mx/ligas/acredita/QFB/data/4\\_2%20Curriculum/4.2.10%20Actas%20de%20C3%A1reas%20Programas%20de%20asig%20y%20Manuales%20Lab/Manuales%20de%20Laboratorio/Microbiolog%C3%ADaLab-pdf/Manual%20Bacteriolog%C3%ADa%20II.pdf](http://www.facultadcienciasquimicas.buap.mx/ligas/acredita/QFB/data/4_2%20Curriculum/4.2.10%20Actas%20de%20C3%A1reas%20Programas%20de%20asig%20y%20Manuales%20Lab/Manuales%20de%20Laboratorio/Microbiolog%C3%ADaLab-pdf/Manual%20Bacteriolog%C3%ADa%20II.pdf)
7. Audición para la vida. [Internet] Anatomía de la audición. 2016 [citado 21 de julio de 2021]. Recuperado a partir de: <http://gonzalo-del-rio.webnode.es/products/referencia-1/>
8. García M.P, Paredes S.F, Fernández del Barrio MT. Microbiología clínica práctica. 2 ed. Barcelona: Servicio Publicaciones de la Universidad de Cádiz; 1994.
9. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 9 ed. Buenos Aires: Elsevier; 2020.
10. Papadakis MA, Mc Phee SJ, Rabow MW. Diagnóstico clínico y tratamiento. 56 ed. México DF: Mc Graw-Hill Interamericana; 2017.
11. Mims CA, Playfair J, Roitt IM, Wakelin D, Williams R, Anderson RM. Microbiología médica. Madrid: Mosby; 1995.
12. Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el laboratorio clínico. Buenos Aires: Panamericana; 2005.
13. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3 ed. Ginebra: OMS; 2005. Recuperado de: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
- 14.



15. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D.C. Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico. Bogotá: Linotipia Bolívar y Cía; 2008. Recuperado de: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/.../Manual%20Toma%20Muestras.pdf>; 2008.
16. Cercenado E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica; 2006. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia23.pdf>
17. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.
18. Delaat A. Microbiología. 2 ed. México DF: Interamericana; 1983.
19. Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital de clínicas. Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Montevideo: Facultad de Medicina; 2004. Recuperado de: <http://ops-uruguay.bvsalud.org/pdf/laboratorio.pdf>
20. bioMérieux. API® 20 E, Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes. bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
20. bioMérieux. Sistemas miniaturizados API®. bioMérieux; 2010. Recuperado de: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_anexo2.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_anexo2.pdf)
21. bioMérieux. Catálogo de medios de cultivo convencionales. México: bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/medios-de-cultivo-convencionales>
22. bioMérieux. API® 20 Staph, Sistema de identificación de estafilococos, micrococcos y géneros relacionados. bioMérieux; 2009. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
- 23.- Prats G. Microbiología clínica. Madrid: Médica Panamericana; 2006.
- 24.- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 ([jalisco.gob.mx](http://jalisco.gob.mx)).





# Unidad Aparato Respiratorio

## PRÁCTICA 4 Diagnóstico de infecciones del tracto respiratorio superior mediante el exudado faríngeo



**Elaborado por:**

Q. F. B. Angélica Ramón Olivera

Q. F. B. Sthefany Liliana Ortega Cortés

Dr. Roberto Cruz González Meléndez



# Índice

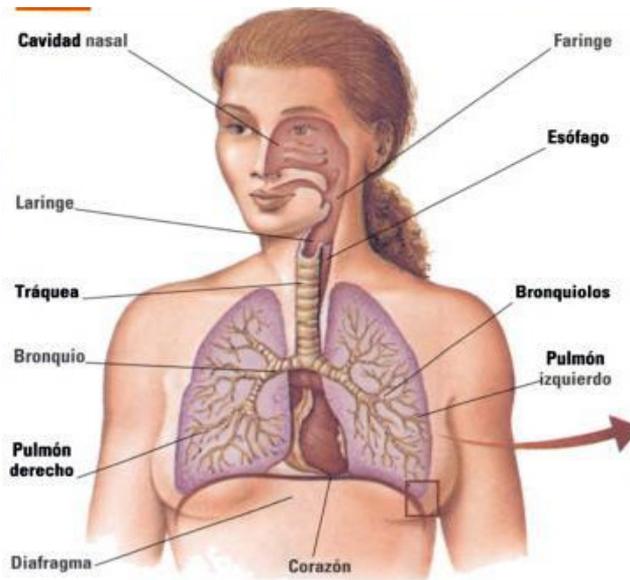
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>155</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>159</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>159</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>162</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>163</b>
V.1 Fase Preanalítica	163
V.2. Fase Analítica	169
V.3. Fase Postanalítica	183
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>184</b>



## I. Introducción

El sistema respiratorio está constituido por un conjunto de órganos cuya función es la de conducir el oxígeno hasta los glóbulos rojos de la sangre. Estos órganos pueden agruparse en dos categorías:

- Las vías respiratorias superiores (la boca, la cavidad nasal, la faringe y la laringe, además del oído medio y externo).
- Las vías respiratorias inferiores (la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los alveolos pulmonares) (**Figura 1**).<sup>(1,2)</sup>



**FIGURA 1.** Anatomía del sistema respiratorio.<sup>(3)</sup>

Las vías respiratorias superiores se encuentran alojadas en la cara y en la parte superior del cuello, y las vías inferiores en la parte inferior del cuello y en el interior del tórax.<sup>(1)</sup>



El tracto respiratorio superior esta colonizado por muchos microorganismos, la mayoría considerados parte de la biota normal. Pero también podemos encontrar microorganismos potencialmente patógenos como son: Estreptococos grupo A ( $\beta$ -hemolíticos), *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Klebsiella*, *Bacteroides*, Enterobacterias, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Bordetella pertussis*. Siendo de esta forma las bacterias los patógenos más virulentos de las vías respiratorias superiores, aunque la mayoría de las infecciones que causan pueden ser prevenidas o tratadas eficazmente. Cabe mencionar que estos microorganismos patógenos pueden estar presentes en la biota normal y no ser la principal causa de la infección. <sup>(4, 5, 6)</sup>

La faringitis es la inflamación de la faringe causada por varios grupos de distintos microorganismos que se propagan de persona a persona por contacto directo o por aerosoles y es considerada la infección de vías respiratorias superiores más frecuente. Las dos causas más comunes de esta infección son:

-  Virus (rinovirus, adenovirus, Coxsackievirus, virus de Epstein-Barr, VIH, virus gripales y para gripales, casi en un 70%).
-  Bacterias: *Streptococcus pyogenes* (grupo A,  $\beta$ -hemolítico) siendo el más importante de diagnosticar debido a que puede causar complicaciones, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae* (tipo B) que ocasiona epiglotitis grave con obstrucción de la vía aérea especialmente en niños pequeños y *Neisseria gonorrhoeae*. Las cuales se adhieren a la superficie mucosa y en ocasiones invaden los tejidos locales.
-  Mientras que el *Mycoplasma* sp. o *Chlamydia pneumoniae* pueden ocasionar gran parte del 30% de los cultivos negativos restantes. <sup>(7, 8, 9)</sup>

La faringitis por *S. pyogenes* (**Figura 2**) varía desde leve a grave y se caracteriza por fiebre, adenomegalia regional, una faringe y úvula de color rojo brillante, exudado purulento en la pared faríngea o amigdalitis con pus en los folículos. Las complicaciones son raras si el tratamiento es inmediato, estas son:

-  Diseminación local para producir periamigdalitis o absceso periamigdalino e infecciones del espacio facial.



- Diseminación distante para producir sinusitis, otitis media, mastoiditis, sepsis consecutiva o extensión a lo largo de la vaina carotidea para producir infección mediastínica.
- Producción de toxina: fiebre escarlatina.
- Lesión inmunitaria: fiebre reumática y glomerulonefritis. <sup>(8)</sup>



**FIGURA 2.** Amigdalitis estreptocócica debida a *S. pyogenes*  $\beta$ -hemolítico grupo A, con eritema intenso en las amígdalas y un exudado cremoso amarillento. <sup>(9)</sup>

El cultivo y el examen microscópico de las muestras de las secreciones del exudado faríngeo son importantes para el diagnóstico de las infecciones de vías respiratorias superiores; ya que nos permite la identificación de las bacterias patógenas, principalmente al *S. pyogenes*. <sup>(8)</sup>

Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Fase preanalítica:** es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma. Se indican los reactivos que serán empleados, y en este caso la correcta manipulación de las cepas puras más representativas a utilizar en cada práctica.



**Fase analítica:** se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados (en El Manual de Operación y Mantenimiento Preventivo de los Equipos utilizados en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas, se describen las especificaciones y características de estos, sus normas de funcionamiento, calibración, etc.) y reactivos.

En esta fase se explica el uso de los medios de cultivos selectivos, diferenciales, de transporte, de enriquecimiento, pruebas bioquímicas y pruebas especiales; así como también de los métodos alternativos de diagnóstico como el sistema API® 20 y de los medios cromogénicos.

**Fase postanalítica:** se refiere a los resultados obtenidos los cuales se especifican en el informe del laboratorio de forma que sea legible y fácil de comprender. A esta fase se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

El control de calidad es responsabilidad de la persona a cargo del área de microbiología, la cual debe asegurarse de que las pruebas realizadas sean procesadas con calidad y de que los resultados sean confiables, reproducibles y tan exactos como sea posible, siguiendo los procedimientos establecidos. <sup>(10)</sup>

En el presente manual se establecen los métodos tradicionales y métodos alternativos (sistema API® 20 y medios cromogénicos) de diagnóstico microbiológico empleados para microorganismos causantes de infecciones del sistema respiratorio.

Esta práctica permitirá el diagnóstico de microorganismos causantes de patologías en los sistemas del cuerpo humano y así tener un mejor conocimiento en cuanto a la identificación de los microorganismos por género y especie.

Cabe señalar que al final de la práctica se realizó un cuestionario que tiene por objetivo validar la utilidad de la misma, y con las opiniones de alumnos y profesores establecer un proceso de mejora continua de esta práctica.



## II. Objetivos

-  Utilizar los procedimientos de los métodos tradicional y alternativo de diagnóstico microbiológico para identificar a los microorganismos patógenos que se encuentran en un exudado faríngeo.
-  Utilizar el sistema API® 20 y medios cromogénicos como métodos alternativos de diagnóstico.
-  Utilizar cepas puras de bacterias frecuentemente encontradas en un exudado faríngeo como control de calidad en los métodos tradicional y alternativo de diagnóstico.

## III. Medidas de bioseguridad

De acuerdo con la publicación de la OMS en 2005, se hace referencia a los peligros relativos que entrañan los microorganismos infecciosos clasificados por grupos de riesgo, la cual se utilizará exclusivamente para el trabajo de laboratorio (**Cuadro 1**).

**CUADRO 1.** Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo. <sup>(11)</sup>

<b>Grupo de riesgo 1</b>	Riesgo individual y poblacional escaso o nulo. Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
<b>Grupo de riesgo 2</b>	Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
<b>Grupo de riesgo 3</b>	Riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
<b>Grupo de riesgo 4</b>	Riesgo individual y poblacional elevado. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.



Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en el tipo de instalaciones (características de diseño, construcción, medios de contención), el equipo a utilizar, las prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con los agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo (**Cuadro 2**). Por ello el nivel de bioseguridad que tiene el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas es de nivel 1. De tal forma que existe una relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad y con ello la clasificación del tipo de laboratorio y el equipo de seguridad. (Cuadro 2)

**CUADRO 2.** Relación del grupo de riesgo con el nivel de bioseguridad, las prácticas y el equipo de laboratorio. <sup>(11)</sup>

Grupo de riesgo	Nivel de bioseguridad	Tipo de laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipo de seguridad
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación.	Técnicas microbiológicas apropiadas.	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto.

Por ello cada laboratorio debe adoptar un manual de seguridad o de trabajo en el que identifiquen los riesgos conocidos y potenciales, y se especifiquen las prácticas y los procedimientos encaminados a eliminar o reducir al mínimo esos riesgos.

A continuación, se mencionan algunos aspectos importantes en cuanto a las medidas de bioseguridad.

### Protección personal:

-  Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
-  Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos (**Figura 3**).



- 🔬 El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
- 🔬 Se usarán gafas de seguridad u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
- 🔬 Estará prohibido usar prendas protectoras fuera de laboratorio.
- 🔬 En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
- 🔬 La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios que la ropa de calle. <sup>(11)</sup>



**FIGURA 3.** Protección personal.

### Zonas de trabajo del laboratorio:

- 🔬 El laboratorio se mantendrá ordenado y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- 🔬 Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso, al inicio y al final de cada jornada de trabajo. <sup>(11)</sup>



### Manipulación de desechos:

Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados deberán ser descontaminados antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a utilizar. <sup>(11)</sup>

- Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. <sup>27</sup>



## IV. Propósito del examen

Esta práctica va encaminada al diagnóstico microbiológico de *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos y otras bacterias aisladas de un exudado faríngeo, que según el criterio clínico puedan interpretarse como patógenas.

Se utilizarán dos métodos: método tradicional y un método alternativo de diagnóstico (sistema API® 20 y medios cromogénicos), empleando cepas puras de bacterias patógenas que se considerarán como control de calidad, con el objetivo de conocer los fundamentos y pasos a seguir de los mismos. De manera que se mejore el proceso de enseñanza y aprendizaje, así como la preparación académica de los alumnos que cursan el módulo de laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas; ya que los alumnos tendrán los conocimientos teóricos y prácticos necesarios para cada una de las etapas de control de calidad de esta práctica.



## V. Metodología

### V.I. Fase Preanalítica

#### INDICACIONES Y PRECAUCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA

Se debe indicar al paciente las siguientes condiciones previas a la toma de muestra.

- 1) No haber estado en tratamiento con antibióticos al menos 7 días antes de la toma de muestra.

**NOTA:** si lo anterior no es posible se debe obtener la muestra justo antes de la administración de la dosis, o tras 48 horas de finalizar el tratamiento.



- 2) No deberá lavarse los dientes antes de la toma de muestra.
- 3) No hacer gárgaras ni limpieza con ninguna solución bucofaríngea.
- 4) Presentarse al laboratorio en ayuno total (no tomar agua). <sup>(4, 12, 13)</sup>
- 5) Antes y después de cada procedimiento lavarse las manos correctamente.





- 6) El personal de laboratorio deberá usar bata (a fin de evitar que la ropa de calle se pueda contaminar o ensuciar), guantes y cubreboca. <sup>(11)</sup>



- 7) Tener preparado hisopos, abate lenguas, portaobjetos y medio de transporte para el Exudado Faríngeo.



- 8) Tener encendido el mechero pues éste dará el área de esterilidad para realizar la toma de muestra.





- 9) Etiquetar el medio del transporte con los datos del paciente. <sup>(11, 12, 14)</sup>



En el siguiente cuadro se enlistan los materiales que se ocuparán durante la práctica

**CUADRO 3.** Material necesario para la práctica del exudado ótico. <sup>(4, 6, 8, 12, 13, 14, 15, 16)</sup>

MATERIAL	CEPAS	MEDIOS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubreboca</li> <li>• Mechero de Bunsen</li> <li>• Gradilla</li> <li>• Hisopos de dacrón o alginato de calcio</li> <li>• Abateluenguas</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Pipeta</li> <li>• Aceite de inmersión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>S. pyogenes</i></li> <li>• <i>S. aureus</i></li> <li>• <i>K. pneumoniae</i></li> <li>• <i>C. diphtheriae</i></li> </ul>	<p>Transporte</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stuar Amies</li> </ul> <p>Cultivo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Sangre de Carnero (ASC) 5%</li> <li>• Agar Chocolate</li> <li>• Agar Soya Tripticasa (AST)</li> <li>• Agar Sal y Manitol</li> <li>• Agar EMB</li> <li>• Agar Loeffler</li> </ul> <p>Susceptibilidad antibióticos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Müeller Hinton</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad a la Bacitracina</li> <li>• Rojo de Fenol más CHO's:</li> <li>• Lactosa</li> <li>• Trehalosa</li> <li>• Sacarosa</li> <li>• Glucosa</li> <li>• Maltosa</li> <li>• Salicina</li> <li>• Leche Tornasol</li> <li>• Azul de Metileno</li> <li>• Prueba de coagulasa</li> </ul>	<p>Tinción de Gram</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristal violeta</li> <li>• Lugol</li> <li>• Alcohol-Cetona</li> <li>• Safranina</li> </ul> <p>Tinción de Cápsula</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tinta China o Rojo Congo</li> <li>• Mordiente de cápsula</li> </ul> <p>Tinción de Albert</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colorante de Albert</li> <li>• Lugol</li> </ul>



MATERIAL	CEPAS	MEDIOS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REACTIVOS
			<ul style="list-style-type: none"><li>• Hugh-Leifson:</li><li>• Manitol con y sin sello</li><li>• Urea de Christensen</li><li>• Citrato de Simmons</li><li>• Caldo Nitrato</li><li>• RMVP</li><li>• SIM</li><li>• TSI</li><li>• LIA</li><li>• MIO</li><li>• Prueba de E</li></ul>	<p>Prueba de catalasa</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Peróxido de hidrógeno</li></ul> <p>SIM</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Kovacs</li></ul> <p>RMVP</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Indicador Rojo de Metilo</li><li>• KOH 40%</li><li>• <math>\alpha</math>-naftol</li></ul> <p>Caldo Nitrato</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ácido sulfanílico</li><li>• <math>\alpha</math>-naftilamina</li></ul>

### PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA DEL EXUDADO FARÍNGEO

- 1) Informar al paciente sobre el procedimiento a realizar. <sup>(17)</sup>
- 2) Colocar al paciente en una silla ergonómica y bajo una buena fuente de luz.





- 3) Se debe enfocar una luz brillante, dentro de la cavidad bucal del paciente, por encima del hombro de la persona que va a tomar la muestra.



- 4) Se indica al paciente que incline la cabeza hacia atrás, respire profundo y abra la boca. La lengua se presiona con suavidad con un abate lenguas para visualizar las fosas amigdalinas y la faringe posterior para localizar el área de inflamación, ulceración y exudado.



- 5) Se dirige el hisopo (alginate de calcio o de dacrón) sobre la lengua hacia la porción posterior de la faringe, entre los pilares amigdalinos y por detrás de la úvula. La emisión de un “ah” por parte del paciente sirve para elevar la úvula y ayuda a reducir el reflejo del vómito.



**NOTA:** se debe tener cuidado de no tocar las paredes laterales de la cavidad bucal, úvula o la lengua para reducir al mínimo la contaminación con bacterias comensales.



- 6) Se pasa el hisopo con un movimiento de barrido suave y haciéndolo rotar entre los pilares amigdalinos, la parte posterior de la faringe y por todo el exudado purulento y/o membranas formadas sobre las lesiones. (4, 10, 12, 14, 15)



- 7) Introducir el hisopo con la muestra en el medio de transporte adecuado a la etiología que se sospeche.

**NOTA:** Transportar durante los primeros 15 minutos de la recolección y a temperatura ambiente. Si no se puede trabajar de inmediato la muestra mantener entre 4-10 °C (no exceder de 2 horas). (12, 14, 17)



- 8) Todos los materiales utilizados deberán desecharse con base en la norma para los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos. (11)





## V.2. Fase Analítica

En esta fase se describen los métodos: tradicional y alternativo de diagnóstico, los cuales son explicados a manera de resumen en el siguiente cuadro (**Cuadro 4**), mostrando el procedimiento a seguir para el diagnóstico microbiológico a partir de muestra clínica o partiendo de cepas puras. Posteriormente ambos métodos serán detallados de forma clara, precisa y sencilla.

**CUADRO 4.** Procedimiento del método: tradicional y alternativo de diagnóstico. <sup>(4, 7, 9, 12, 19, 21)</sup>

Método tradicional		Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
<p style="text-align: center;"><b>Cultivo</b></p> <p>De la muestra del exudado ótico para aislamiento en la superficie del medio.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar placas 35-37 °C / 24-48 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Tinción de Gram</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Examen microscópico Objetivo 100X</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Pruebas bioquímicas</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Susceptibilidad a antibióticos (Antibiograma)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Identificación de bacterias</p>		<p style="text-align: center;"><b>Sistema API® 20</b></p> <p>Preparación de la galería Colocar 5 ml de agua en el panel de pocillos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Preparación del inóculo A partir de una colonia aislada del microorganismo, preparar una suspensión bacteriana con 2 ml de agua.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Inoculación de la galería Llenar con la suspensión bacteriana desde el ensayo VP al ADH.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Con el sobrante de la suspensión anterior preparar una nueva, y repartir desde el ensayo RIB al GLYG</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cubrir con parafina las cúpulas desde el ensayo ADH al GLYG.</p>	



Método tradicional		Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
		<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Cerrar la cámara de incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Incubar 35-37 °C / 18-24 horas</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Lectura de la galería</p> <p style="text-align: center;">Se da por comparación de los colores con las tablas de lectura:</p> <p style="text-align: center;">* Se anotan los resultados que no requieren ser revelados.</p> <p style="text-align: center;">*Posteriormente se agregan los reactivos necesarios para revelar las pruebas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Interpretación</p> <p style="text-align: center;">Determinación del perfil numérico</p>	
		<p style="text-align: center;"><b>Medios cromogénicos</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Sembrar muestra En la superficie del medio.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Incubar placas 35-37 °C / 24 horas.</p> <p><b>NOTA:</b> reducir al mínimo la exposición a la luz antes y durante la incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Observar colonias</p>	



## A) DESCRIPCIÓN MÉTODO TRADICIONAL

La sospecha clínica de faringitis debe confirmarse a través del examen por cultivo y posteriormente microscópico de las colonias aisladas.

### CULTIVO

1) Sembrar la muestra obtenida por estría cruzada (Figura 4) en las placas de alguno de los siguientes medios de cultivo, dependiendo la sospecha clínica del médico:

-  ASC 5%
-  Agar Chocolate
-  AST
-  Agar Sal y Manitol
-  Agar EMB
-  Agar Loeffler (*C. diphtheriae*).
-  Agar Thayer-Martín (*N. gonorrhoeae*).
-  Agar Regan-Lowe (*B. pertusis*).<sup>( 4, 7, 9, 12, 18, 19)</sup>

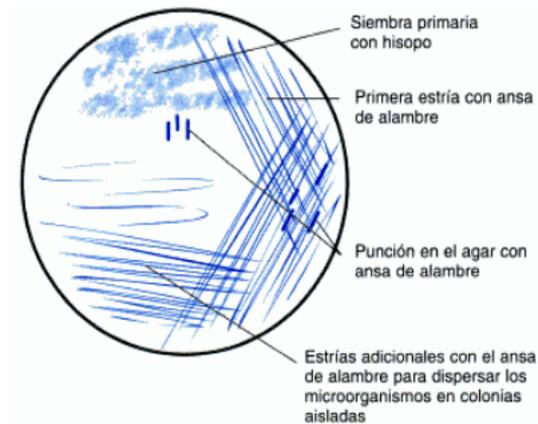


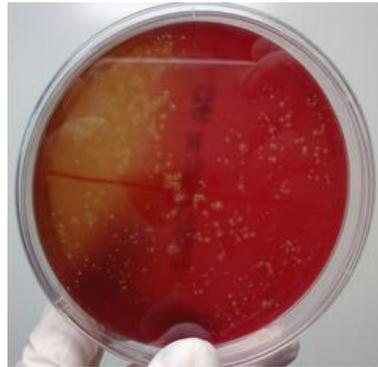
FIGURA 4. Técnica de estría, punción y aislamiento de estreptococos  $\beta$ -hemolíticos.<sup>(4)</sup>



- 2) Incubar 24 a 48 horas a 37 ° C.

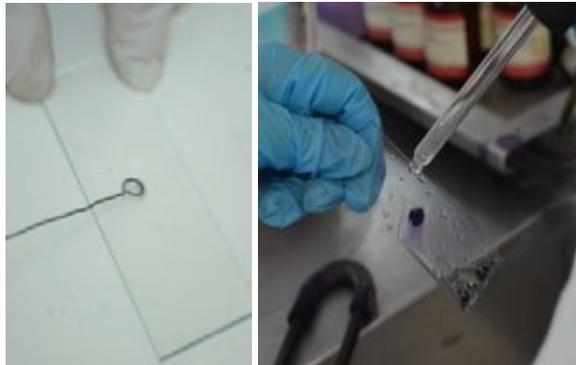


- 3) Observar la morfología colonial de las bacterias en cada uno de los medios inoculados, a fin de seleccionar el crecimiento del posible patógeno. <sup>(4)</sup>



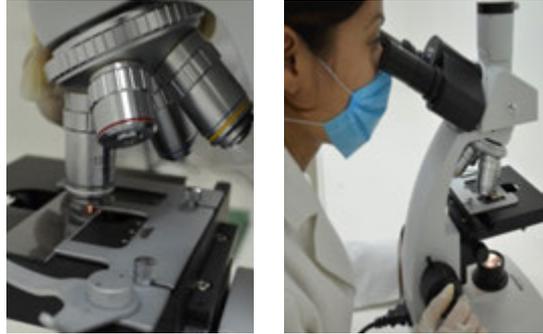
- 4) Realizar las preparaciones de las colonias aisladas en cada una de las placas y teñir con la técnica de Gram.

**NOTA:** si se requiere, realizar la tinción de cápsula o de Albert.





- 5) Observar las preparaciones al microscopio utilizando el objetivo 100X. <sup>(4)</sup>



- 6) Realizar la inoculación de las pruebas bioquímicas seleccionadas a partir de las colonias aisladas del medio de cultivo utilizado, de acuerdo al criterio y resultado sugerente al tipo de microorganismo aislado en los mismos.



- 7) Incubar 24 a 48 horas a 37 °C.

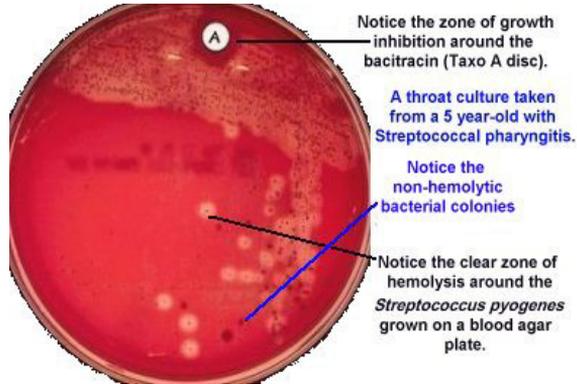


- 8) Realizar las lecturas de las pruebas realizadas. <sup>(4)</sup>



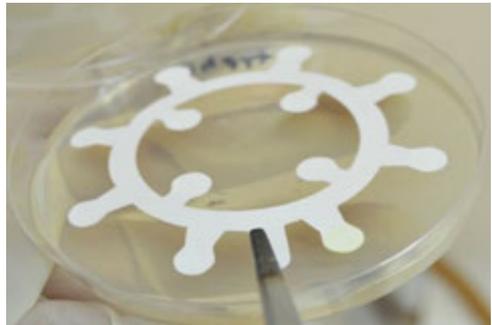
## SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

9) Realizar antibiograma (Figura 5) del agente etiológico.



**FIGURA 5.** Placa de Agar Sangre en donde se puede observar la inhibición de *S. pyogenes* alrededor del disco "A" de Bacitracina. <sup>(2)</sup>

10) En una placa de Agar Müeller Hinton inocular en todo el medio el microorganismo identificado, a partir de una colonia aislada.





**11)** Incubar la placa a 35-37 °C por 24 horas.



**12)** Realizar la lectura del antibiograma, utilizando la hoja para sensibilidad a antibióticos. (ANEXO III) <sup>(4)</sup>

## RESULTADOS

**13)** Reportar todos los resultados en los formatos, para tinción, morfología colonial, pruebas bioquímicas y pruebas especiales. (ANEXO I).

**14)** Realizar la discusión de los resultados y las conclusiones.

## B) DESCRIPCIÓN MÉTODO ALTERNATIVO

### SISTEMA API® 20

**1)** Una vez identificado el agente etiológico a partir del cultivo y la observación al microscopio, inocular el sistema API® 20 correspondiente:

-  API® 20 Strep: *S. pyogenes*
-  API® 20 Staph: *S. aureus*
-  API® 20 E: *K. pneumoniae*
-  API® 20 Coryne: *C. diphtheriae*



- 2) Todas las instrucciones para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada uno de los microtubos, y las condiciones de incubación se pueden encontrar claramente especificadas en los instructivos de uso señalados por el fabricante para cada tipo de galería. <sup>(20)</sup>

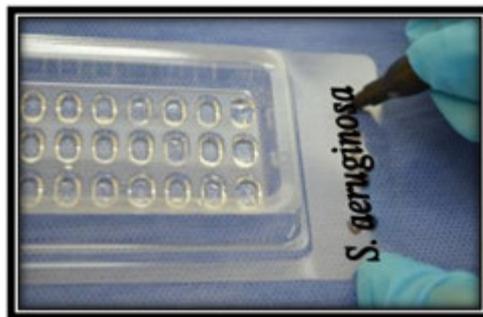
**NOTA:** para ilustrar esta práctica utilizaremos *S. pyogenes* como agente etiológico.

### PREPARACIÓN DE LA GALERÍA

- 3) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como  $Cl_2$ ,  $CO_2$ , etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.

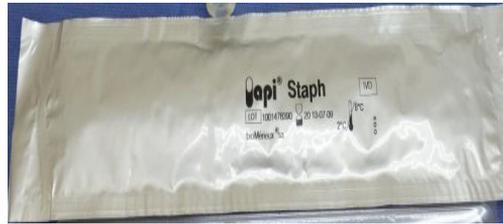


- 4) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (**No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación**).





- 5) Sacar una galería API® 20 Strep de su envase individual y colocar la galería en la cámara de incubación. <sup>21</sup>



### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 6) Abrir una ampolla de API Suspensión Medium (2 ml) o bien utilizar un tubo que contenga 2 ml de agua destilada:
- a) Introducir la ampolla en el protector de ampolla (tapón blanco).
  - b) Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - c) Presionar a fondo el tapón blanco.
  - d) Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
  - e) Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
  - f) Retirar delicadamente el tapón.





- 7) A partir de la cepa pura o una colonia bien aislada del microorganismo, preparar una suspensión bacteriana homogénea y muy densa con una turbidez superior a 4 de McFarland.



- 8) Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación. <sup>(21)</sup>



### INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 9) Con ayuda de una pipeta, rellenar la primera mitad de la galería (desde el ensayo VP al ADH) con la suspensión anterior. Para evitar la formación de burbujas, inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.



- Para los ensayos desde VP al LAP, agregar aproximadamente 100  $\mu$ l en cada cúpula.
- Para el ensayo ADH: llenar únicamente el tubo.





**10)** En la segunda mitad de la galería (desde el ensayo RIB al GLYG):

 Abrir una ampolla de API GP Medium y transferir allí el resto de la suspensión (0,5 ml como mínimo). Homogeneizar bien.



 Repartir esta nueva suspensión sólo en los tubos.

**11)** Crear anaerobiosis llenando las cúpulas de las pruebas subrayadas desde la ADH a la GLYG con aceite de parafina, provocando un menisco convexo.



**12)** Cerrar la cámara de incubación.

**13)** Incubar durante 18-24 horas a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  en aerobiosis. <sup>(21)</sup>





## LECTURA DE LA GALERÍA

**14)** Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. **(ANEXO II)**

**15)** Después del periodo de incubación, el desarrollo de las reacciones se dará por la adición de 1 gota de cada uno de los siguientes reactivos y a continuación se interpretan todas las reacciones conforme a la tabla de identificación **(ANEXO II)**:



**VP:** Añadir una gota de VP1 y una de VP2.

Positivo: color rosa fuerte o rojo en 10 minutos.

Negativo: incoloro o color rosa débil después de 10 minutos.



**HIP:** Añadir dos gotas de NIN.

Positivo: color azul oscuro o violeta en 10 minutos.

Negativo: incoloro, color azul pálido o gris azulado después de 10 minutos.



**PYRA,  $\alpha$  GAL,  $\beta$  GUR,  $\beta$  GAL, PAL, LAP:** Añadir una gota de ZYM A y ZYM B (\*).

Positivo: PYRA (naranja),  $\alpha$  GAL (violeta),  $\beta$  GUR (azul),  $\beta$  GAL (violeta), PAL (violeta), LAP (naranja) en 10 minutos.

Negativo: PYRA (incoloro o naranja muy pálido),  $\alpha$  GAL (incoloro),  $\beta$  GUR (incoloro),  $\beta$  GAL (incoloro o violeta muy pálido), PAL (incoloro o violeta muy pálido), LAP (incoloro) después de 10 minutos.

(\*). Se recomienda controlar cada ampolla de reactivo ZYM B antes de la 1era utilización. <sup>(21)</sup>

**16)** Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato. **(ANEXO II)**



INTERPRETACIÓN

17) Determinación del perfil numérico

En la hoja de resultados, los ensayos se separan en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 0, 1, 2 ó 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

-  Si la reacción es negativa se pone 0.
-  Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo o 4 si es el tercero.
-  Se suman los valores de cada triplete y con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras que constituye el perfil numérico (**Cuadro 5**).<sup>(19)</sup>



**CUADRO 5.** Determinación del perfil numérico API® 20 STREP<sup>(21)</sup>

+			-			+			-			+			+			+			-			-		
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	1	2		
VP	HIP	ESC	PYRA	αGAL	DGLUR	βGAL	PAL	LAP	ADHI	EBB	ARA	MAN	SOB	LAC	TRE	INS1	EAE	AMD	GLYG	BHEM						
5			2			4			0			7			7			0								
5 240 770 <i>Streptococcus mutans</i>																										

**NOTA:** La reacción hemolítica constituye el ensayo nº 21; la β-hemólisis se considera como positiva y su valor numérico es 4. Cualquier otra reacción hemolítica se considera como negativa y su valor numérico es 0.<sup>(21)</sup>

18) La identificación se realiza a partir de la base de datos.<sup>(21)</sup>



## MEDIOS CROMOGENICOS

Una vez identificado el agente etiológico y si se tratará de *S. aureus*, inocular el medio cromogénico correspondiente:

 chromID™ *S. aureus* (SAID): *S. aureus*



19) Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa.



20) Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35-37 °C durante 24 horas en posición invertida. En caso de resultado negativo a las 24 horas, incubar nuevamente durante 24 horas más para registrar los resultados finales.

**NOTA:** Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella, ya que la luz puede destruir los cromógenos.





- 21) Una vez que los colores de las colonias se hayan desarrollado, el agar cromogénico se puede exponer a la luz, para efectuar la lectura de las placas contra un fondo blanco.
- 22) Anotar el resultado correspondiente en el formato de reporte de resultados. (ANEXO II)



**FIGURA 6.** Placa de Agar SAID en donde se puede observar la identificación de *S. aureus* (colonias verdes). <sup>(22)</sup>

23) El medio cromogénico para *S. aureus* permite la detección de:

-  *S. aureus* (colonias de color verde). Basada en el desarrollo espontáneo del color verde de las colonias productoras de glucosidasa. (Figura 6)
-  *S. epidermidis* (colonias blancas)
-  *S. saprophyticus* (colonias rosas)
-  *S. xylosus* (colonias malva).
-  Inhibición de otras bacterias (Gram+ y Gram-) y levaduras. <sup>(22)</sup>

## V.I Fase Postanalítica

Se refiere a los resultados obtenidos, los cuales se especifican en el informe de laboratorio de forma que sea legible y fácil de comprender. (ANEXO IV) <sup>(10)</sup>



## VI. Referencias

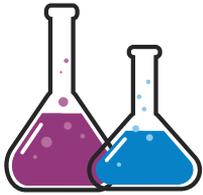
1. Rodríguez Pinto M. Anatomía, Fisiología e Higiene. 2ª Ed. México: Edelvive; 2016.
2. Universidad Nacional Autónoma de México. Exudado Faríngeo. 2016. Recuperado a partir de: <http://procedimientosmicrobiologicos.wikispaces.com/EXUDADO+FAR%C3%8DNGEO>
3. Campos P. Biología 2. Barcelona: Limusa; 2002.
4. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop P., Schreckenberger P., Woods G. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. 6 ed. Médica Panamericana: Buenos Aires; 2008.
5. Ingraham JL, Ingraham CA. Introducción a la microbiología. Vol. II. Barcelona: Reverte; 1998.
6. Ryan KJ, Ray CG. Microbiología médica. 6 ed. México DF: Mc Graw Hill; 2017.
7. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas y Bennett. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 9 ed. Buenos Aires: Elsevier; 2020.
8. Spicer WJ. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. Texto y atlas en color. 2 ed. Barcelona: Elsevier; 2009.
9. Mims CA, Playfair J, Raitt IM, Wakelin D, Williams R, Anderson RM. Microbiología médica. Madrid: Mosby; 1995.
10. Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el laboratorio clínico. Buenos Aires: Panamericana; 2005.
11. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3 ed. Ginebra: OMS; 2005. Disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
12. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D.C. Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico. Bogotá: Linotipia Bolívar y Cía; 2008. Recuperado de: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/.../Manual%20Toma%20Muestras.pdf>; 2008.
13. Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital de clínicas. Manual de toma de muestras para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico. Montevideo: Facultad de Medicina; 2004. Recuperado de: <http://ops-uruguay.bvsalud.org/pdf/laboratorio.pdf>



14. Hernando Moreno A, Gutiérrez López E. Higiene del medio hospitalario y limpieza de material. Madrid: Editex; 2009.
15. Cercenado E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica; 2006. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia23.pdf>
16. bioMérieux. Catálogo de medios de cultivo convencionales. México: bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/medios-de-cultivo-convencionales>
17. Delaat A. Microbiología. 2 ed. México DF: Interamericana; 1983.
18. López García MJ, Cárdenas Povedano M, Urbano Felices A. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias. Barcelona: OmniaScience; 2012.
19. Lynch MJ, Raphael SS, Mellor LD, Spare PD, Inwood MJ. Métodos de laboratorio. 2 ed. México DF: Interamericana; 1977.
20. bioMérieux. Sistemas miniaturizados API®. bioMérieux; 2010. Disponible en: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_anexo2.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_anexo2.pdf)
21. bioMérieux. API® 20 Strep, Sistema de identificación de los Streptococcaceae y otros gérmenes emparentados. bioMérieux; 2009. Recuperado de: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_anexo2.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_anexo2.pdf)
22. bioMérieux. Catálogo de medios de cultivo convencionales. México: bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/medios-de-cultivo-convencionales>
23. bioMérieux. API® 20 Staph, Sistema de identificación de estafilococos, micrococos y géneros relacionados. bioMérieux; 2009. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
24. bioMérieux. API® 20 E, Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes. bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
- 25.



26. Manual de procedimientos del laboratorio médico de Toronto, Identificación de *Corynebacterium* (API Coryne). 2000. Recuperado de: [http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04\\_01.pdf](http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04_01.pdf)
27. Prats G. Microbiología clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
28. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 ([jalisco.gob.mx](http://jalisco.gob.mx))



# Unidad Aparato Respiratorio

## PRÁCTICA 5

### Diagnóstico de infecciones del aparato respiratorio superior mediante el exudado nasofaríngeo



**Elaborado por:**

Q. F. B. Angélica Ramón Olivera  
Q. F. B. Sthefany Liliana Ortega Cortés  
Dr. Roberto Cruz González Meléndez



# Índice

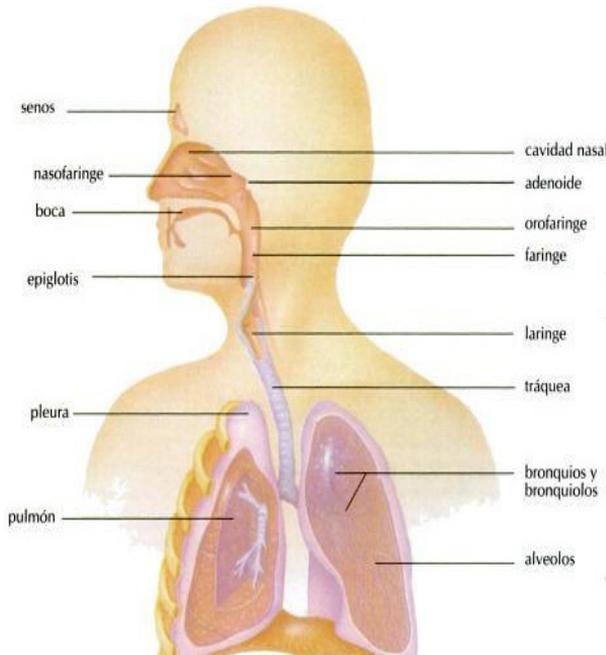
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>189</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>193</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>193</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>196</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>197</b>
V.1 Fase Preanalítica	197
V.2. Fase Analítica	202
V.3. Fase Postanalítica	216
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>216</b>



## I. Introducción

El sistema respiratorio está constituido por un conjunto de órganos cuya función es la de conducir el oxígeno hasta los glóbulos rojos de la sangre. Estos órganos pueden agruparse en dos categorías:

- 🧪 Las vías respiratorias superiores (la boca, la cavidad nasal, la faringe y la laringe, además del oído medio y externo).
- 🧪 Las vías respiratorias inferiores (la tráquea, los bronquios, los bronquiolos y los alveolos pulmonares) (**Figura 1**). <sup>(1,2)</sup>



**FIGURA 1.** Anatomía del sistema respiratorio. <sup>(3)</sup>

Las vías respiratorias superiores se encuentran alojadas en la cara y en la parte superior del cuello, y las vías inferiores en la parte inferior del cuello y en el interior del tórax. <sup>(1)</sup>



El tracto respiratorio superior esta colonizado por muchos microorganismos, la mayoría considerados parte de la biota normal. Pero también podemos encontrar microorganismos potencialmente patógenos como son: Estreptococos grupo A ( $\beta$ -hemolíticos), *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, especies de *Klebsiella*, *Bacteroides*, Enterobacterias, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Bordetella pertussis*. Siendo de esta forma las bacterias los patógenos más virulentos de las vías respiratorias superiores, aunque la mayoría de las infecciones que causan pueden ser prevenidas o tratadas eficazmente. Cabe mencionar que estos microorganismos patógenos pueden estar presentes en la biota normal y no ser la principal causa de la infección. <sup>(3, 4, 5)</sup>

El resfriado común es la infección más frecuente originada de la nasofaringe, causado casi siempre por uno de los más de 100 serotipos de rinovirus. Esta infección rara vez pone en riesgo la vida, sin embargo, el resfriado común es la principal causa de morbilidad y dada la gran cantidad de días laborales que se pierde en esta afección se convierte en un problema económico relevante. El síntoma principal es la rinitis (goteo de la nariz). No se presenta fiebre como parte de la infección. Los estudios de laboratorio no son necesarios porque la enfermedad es auto limitada y no se dispone aún de un tratamiento específico.

La obtención de muestras nasofaríngeas es de muy poco valor práctico, excepto en algunas situaciones definidas. Pero son la muestra de elección para el aislamiento de *B. pertussis* el agente etiológico de la tos ferina, *H. influenzae* y para la detección de portadores de *S. aureus* y *N. meningitidis*. <sup>(4, 6)</sup>

La tos ferina o “tos convulsiva” es una enfermedad caracterizada por ataques prolongados e incontrolables de tos, es exclusiva del hombre y presenta una tasa de ataque mayor al 90% entre individuos no inmunizados. A pesar de ser una enfermedad de la niñez, la infección por *B. pertussis* puede presentarse a cualquier edad. Es una enfermedad muy contagiosa que se acompaña de una morbilidad y mortalidad significativas. La transmisión se produce de persona a persona, al inhalar las pequeñas gotitas de secreciones producidas en forma de aerosoles al toser.

Está se manifiesta en tres períodos: <sup>(3, 7)</sup>

 Período prodrómico o catarral: dura 1-2 semanas y es indistinguible de las infecciones víricas de las vías respiratorias superiores. Se manifiesta como un catarro con rinorrea, tos leve, pero de predominio nocturno, estornudos, conjuntivitis, malestar y lagrimeo.



- 🧪 **Período paroxístico:** dura 1-4 semanas y se caracteriza por ataques de tos muy intensos (Figura 2), que terminan en unos segundos de apnea, seguida de una inspiración ruidosa (silbido) que se escucha al final de cada crisis de tos.
- 🧪 **Período de declinación:** se prolonga de semanas a meses, los ataques de tos disminuyen paulatinamente, pero ciertos estímulos como una infección respiratoria vírica puede provocar la reaparición de dichos ataques. <sup>(4, 8, 9)</sup>



**FIGURA 2.** Crisis de tos paroxística. <sup>(7)</sup>

Las complicaciones pueden ser:

- 🧪 **Hemorragias:** por aumento de presión durante el ataque de tos y pueden ser nasales, conjuntivales, palpebrales, petequias en la cara e incluso cerebrales.
- 🧪 **Neurológicas:** debido a las hemorragias, convulsiones y encefalitis intensas.
- 🧪 **Respiratorias:** por infecciones. <sup>(9)</sup>

Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Fase preanalítica:** es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se indica el procedimiento para



la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma. Se indican los reactivos que serán empleados, y en este caso la correcta manipulación de las cepas puras más representativas a utilizar para esta práctica.

**Fase analítica:** se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados (en El Manual de Operación y Mantenimiento Preventivo de los equipos utilizados en el Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas, se describen las especificaciones y características de estos, sus normas de funcionamiento, calibración, etc.) y reactivos.

En esta etapa se explica el uso de los medios de cultivos selectivos, diferenciales, de transporte, de enriquecimiento, pruebas bioquímicas y pruebas especiales; así como también de los métodos alternativos de diagnóstico como el sistema API® 20 y de los medios cromogénicos.

**Fase postanalítica:** se refiere a los resultados obtenidos los cuales se especifican en el informe del laboratorio de forma que sea legible y fácil de comprender. A esta fase se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

El control de calidad es responsabilidad de la persona a cargo del área de microbiología, la cual debe asegurarse de que las pruebas realizadas sean procesadas con calidad y de que los resultados sean confiables, reproducibles y tan exactos como sea posible, siguiendo los procedimientos establecidos. <sup>(10)</sup>

En el presente trabajo se establecen los métodos tradicionales y métodos alternativos (sistema API® 20 y medios cromogénicos) de diagnóstico microbiológico empleados para microorganismos causantes de infecciones del sistema respiratorio. Esta práctica permitirá el diagnóstico de microorganismos causantes de patologías en los sistemas del cuerpo humano y así tener un mejor conocimiento en cuanto a la identificación de los microorganismos por género y especie.

Cabe señalar que al final de la práctica se realizó un cuestionario que tiene por objetivo validar la utilidad de la misma, y con las opiniones de alumnos y profesores establecer un proceso de mejora continua de esta práctica.



## II. Objetivos

-  Utilizar los procedimientos de los métodos tradicional y alternativo de diagnóstico microbiológico para identificar a los microorganismos patógenos que se encuentran en un exudado nasofaríngeo.
-  Utilizar el sistema API® 20 y medios cromogénicos como métodos alternativos de diagnóstico.
-  Utilizar cepas puras de bacterias frecuentemente encontradas en un exudado nasofaríngeo como control de calidad en los métodos tradicional y alternativo de diagnóstico.

## III. Medidas de bioseguridad

De acuerdo con la publicación de la OMS en 2005, se hace referencia a los peligros relativos que entrañan los microorganismos infecciosos clasificados por grupos de riesgo, la cual se utilizará exclusivamente para el trabajo de laboratorio (**Cuadro 1**).

**CUADRO 1.** Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo. <sup>(11)</sup>

<b>Grupo de riesgo 1</b>	Riesgo individual y poblacional escaso o nulo. Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
<b>Grupo de riesgo 2</b>	Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
<b>Grupo de riesgo 3</b>	Riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
<b>Grupo de riesgo 4</b>	Riesgo individual y poblacional elevado. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.



Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en el tipo de instalaciones (características de diseño, construcción, medios de contención), el equipo a utilizar, las prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con los agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo (Cuadro 2). Por ello el nivel de bioseguridad que tiene el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas es de nivel 1. De tal forma que existe una relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad y con ello la clasificación del tipo de laboratorio y el equipo de seguridad.

**CUADRO 2.** Relación del grupo de riesgo con el nivel de bioseguridad, las prácticas y el equipo de laboratorio. <sup>(11)</sup>

Grupo de riesgo	Nivel de bioseguridad	Tipo de laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipo de seguridad
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación.	Técnicas microbiológicas apropiadas.	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto.

Por ello cada laboratorio debe adoptar un manual de seguridad o de trabajo en el que identifiquen los riesgos conocidos y potenciales, y se especifiquen las prácticas y los procedimientos encaminados a eliminar o reducir al mínimo esos riesgos.

A continuación, se mencionan algunos aspectos importantes en cuanto a las medidas de bioseguridad.

### Protección personal:

-  Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio (Figura 3).
-  Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.



- 🔬 El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
- 🔬 Se usarán gafas de seguridad u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
- 🔬 Estará prohibido usar prendas protectoras fuera de laboratorio.
- 🔬 En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
- 🔬 La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios que la ropa de calle. <sup>(11)</sup>



**FIGURA 3.** Protección personal.

**Zonas de trabajo del laboratorio:**

- 🔬 El laboratorio se mantendrá ordenado y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- 🔬 Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso, al inicio y al final de cada jornada de trabajo. <sup>(11)</sup>



## Manipulación de desechos:

Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados deberán ser descontaminados antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a utilizar. <sup>(11)</sup>

 Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. <sup>27</sup>



## IV. Propósito del examen

El diseño de esta práctica va encaminado al diagnóstico microbiológico de *Bordetella pertussis* y otras bacterias aisladas de un exudado nasofaríngeo, que según el criterio clínico puedan interpretarse como patógenas.

Se utilizarán dos métodos: método tradicional y método alternativo de diagnóstico (sistema API® 20 y medios cromogénicos), empleando cepas puras de bacterias patógenas que se considerarán como control de calidad, con el objetivo de conocer los fundamentos y pasos a seguir de los mismos. De manera que se pretende mejorar el proceso de enseñanza y aprendizaje, así como la preparación académica de los alumnos que cursan el módulo de laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas; ya que los alumnos tendrán los conocimientos teóricos y prácticos necesarios para cada una de las etapas de control de calidad de esta práctica.



## V. Metodología

### V.I. Fase Preanalítica

#### INDICACIONES Y PRECAUCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA

Se debe indicar al paciente las siguientes condiciones previas a la toma de muestra.

- 1) No haber estado en tratamiento con antibióticos al menos 7 días antes de la toma de muestra.

**NOTA:** si lo anterior no es posible se debe obtener la muestra justo antes de la administración de la dosis, o tras 48 horas de finalizar el tratamiento.



- 2) No hacer gárgaras ni limpieza con ninguna solución bucofaríngea.
- 3) Presentarse al laboratorio para tomar la muestra preferiblemente en ayunas.
- 4) Antes y después de cada procedimiento lavarse las manos correctamente.





- 5) El personal de laboratorio deberá usar bata (a fin de evitar que la ropa de calle se pueda contaminar o ensuciar), guantes y cubrebocas. <sup>(11)</sup>



- 6) Tener preparado hisopos y medio de transporte para el Exudado Nasofaríngeo.

**NOTA:** El hisopo debe ser de dacron o alginato de calcio. Nunca usar un hisopo de algodón ya que éste contiene ácidos grasos que son dañinos para *B. pertussis*. <sup>(12)</sup>



- 7) Tener encendido el mechero pues éste dará el área de esterilidad para realizar la toma de muestra.





9) Etiquetar el medio del transporte con los datos del paciente. <sup>(6, 11, 12)</sup>



En el cuadro 3 se enlistan los materiales que se ocuparán durante la práctica.

**CUADRO 3.** Material necesario para la práctica del exudado nasofaríngeo. <sup>(4, 6, 11, 16, 17, 20, 25)</sup>

MATERIAL	CEPAS	MEDIOS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubreboca</li> <li>• Mechero Bunsen</li> <li>• Gradilla</li> <li>• Hisopos de dacrón o alginato de calcio</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Pipeta</li> <li>• Aceite de inmersión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>H. influenzae</i></li> <li>• <i>S. aureus</i></li> <li>• <i>H. influenza</i></li> <li>• <i>C. diphtheriae</i></li> </ul>	<p>Transporte</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stuar Amies</li> <li>• Regan Lowe semisólido</li> </ul> <p>Cultivo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Sangre de Carnero (ASC) 5%</li> <li>• Agar Chocolate</li> <li>• Agar Sal y Manitol</li> <li>• Agar Regan Lowe o Bordet Gengou</li> <li>• Agar Loeffler</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rojo de Fenol más CHO's:</li> <li>• Lactosa</li> <li>• Maltosa</li> <li>• Sacarosa</li> <li>• Trehalosa</li> <li>• Glucosa</li> <li>• Arabinosa</li> <li>• Xilosa</li> <li>• Manosa</li> <li>• Fructuosa</li> <li>• Ribosa</li> <li>• Leche Tornosol</li> <li>• Prueba de coagulasa</li> <li>• Hugh-Leifson: Manitol con y sin sello</li> <li>• Urea de Christensen</li> <li>• Citrato de Simmons</li> </ul>	<p>Tinción de Gram</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristal violeta</li> <li>• Lugol</li> <li>• Alcohol-Cetona</li> <li>• Safranina</li> </ul> <p>Tinción de Albert</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colorante de Albert</li> <li>• Lugol</li> </ul> <p>Prueba de catalasa</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peróxido de hidrógeno</li> </ul> <p>Caldo Nitrato</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido sulfanílico</li> <li>• <math>\alpha</math>-naftilamina</li> </ul> <p>RMVP</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Indicador Rojo de Metilo</li> <li>• KOH 40%</li> <li>• <math>\alpha</math>-naftol</li> </ul>



MATERIAL	CEPAS	MEDIOS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REACTIVOS
		Susceptibilidad antibióticos • Agar Müeller Hinton	• Caldo Nitrato • RMVP • SIM • TSI • MIO • Prueba de Elek	RMVP • Indicador Rojo de Metilo • KOH 40% • $\alpha$ -naftol SIM y MIO • Kovacs

### PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA DEL EXUDADO NASOFARÍNGEO

1) Informar al paciente sobre el procedimiento a realizar. <sup>(13)</sup>

2) Colocar al paciente en una silla ergonómica y bajo una buena fuente de luz.



3) Poner la cabeza del paciente en un ángulo de 70°..





- 4) Introducir el hisopo de dacron en una fosa nasal, deslizándolo por la mucosa del piso de está, hasta tocar la pared posterior de la faringe.



- 5) Tocar la parte posterior de la nasofaringe haciendo girar el hisopo 15-30 segundos para permitir la impregnación del microorganismo.

**NOTA:** No introducir el hisopo hacia arriba siguiendo la forma de la nariz; el hisopo debe dirigirse hacia atrás siguiendo el piso de la nariz. <sup>(4, 12, 14)</sup>



- 6) Retirar el hisopo con suavidad y ponerlo en el medio de transporte adecuado a la etiología que se sospeche. Utilizar un segundo hisopo para la otra fosa nasal y repetir el procedimiento.

**NOTA:** Transportar durante los primeros 15 minutos de la recolección y a temperatura ambiente. Si no se puede trabajar de inmediato la muestra mantener entre 4-10 °C (no exceder de 2 horas). <sup>(4, 6, 12, 15, 16)</sup>





- 7) Todos los materiales utilizados deberán desecharse con base en la norma para el manejo de los Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos. <sup>(11, 12)</sup>



## V.2. Fase Analítica

En esta fase se describen los métodos: tradicional y alternativo de diagnóstico, los cuales son explicados a manera de resumen en el cuadro 4, en donde se muestra el procedimiento a seguir para el diagnóstico microbiológico a partir de la muestra clínica o partiendo de cepas puras. Posteriormente ambos métodos serán detallados de forma clara, precisa y sencilla.

**CUADRO 4.** Procedimiento del método: tradicional y alternativo de diagnóstico. <sup>(4, 5, 6, 19)</sup>

Método tradicional		Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
<p style="text-align: center;"><b>Cultivo</b></p> <p>De la muestra del exudado nasofaríngeo para aislamiento en la superficie del medio.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar placas 35-37 °C / 24-48 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Tinción de Gram</p>		<p style="text-align: center;"><b>Sistema API® 20</b></p> <p>Preparación de la galería</p> <p>Colocar 5 ml de agua en el panel de pocillos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Preparación del inóculo</p> <p>A partir de una colonia aislada del microorganismo, preparar una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a 0.5 McFarland.</p>	



Método tradicional		Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Examen microscópico Objetivo 100X</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Susceptibilidad a antibióticos (Antibiograma)</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Identificación de bacterias</p>	<p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Pruebas bioquímicas</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Inoculación de la galería Llenar con la suspensión bacteriana los microtubos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Cubrir con parafina las cúpulas desde el ensayo ADH y URE.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Cerrar la cámara de incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Incubar 36 ± 2 °C / 18-24 horas</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Lectura de la galería Se da por comparación de los colores con las tablas de lectura: * Se anotan los resultados que no requieren ser revelados.</p> <p style="text-align: center;">*Posteriormente se agregan los reactivos necesarios para revelar las pruebas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Interpretación Determinación del perfil numérico</p>		
	<p style="text-align: center;"><b>Medios cromogénicos</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Sembrar muestra En la superficie del medio.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Incubar placas 35-37 °C / 24 horas.</p> <p style="text-align: center;"><b>NOTA:</b> reducir al mínimo la exposición a la luz antes y durante la incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Observar colonias</p>		



## A) DESCRIPCIÓN MÉTODO TRADICIONAL

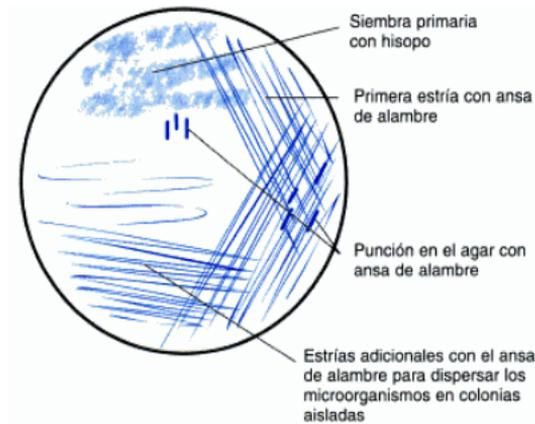
La sospecha clínica de una infección nasal debe confirmarse a través del examen por cultivo y posteriormente microscópico de las colonias aisladas.

### CULTIVO

1) Sembrar la muestra obtenida por estría cruzada (Figura 4) en las placas según corresponda:

-  ASC 5%
-  Agar Chocolate
-  Agar Sal y Manitol
-  Agar Regan-Lowe o Bordet Gengou (*B. pertussis*).
-  Agar Loeffler (*C. diphtheriae*).
-  Agar Thayer-Martín (*N. meningitidis*). (4, 12, 16, 17, 18)

**NOTA:** Por la poca frecuencia en el aislamiento de hongos en el exudado nasofaríngeo, no se incluye un medio de cultivo, las colonias son observable en agar sangre.



**FIGURA 4.** Técnica de estría, punción y aislamiento de la muestra. (4)



- 2) Incubar 24 a 48 horas a 37 °C.

**NOTA:** el medio de cultivo para *B. pertussis* debe incubarse hasta 7-10 días en ambiente húmedo.

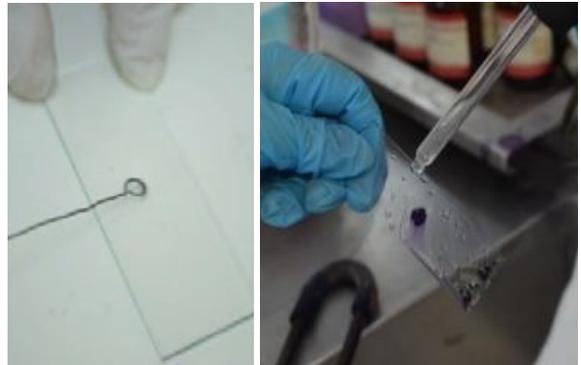


- 3) Observar la morfología colonial de las bacterias en cada uno de los medios inoculados, a fin de seleccionar el crecimiento del posible patógeno. <sup>(4, 17)</sup>



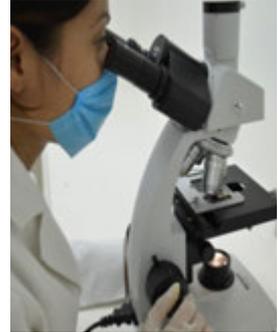
- 4) Realizar las preparaciones de las colonias aisladas en cada una de las placas y teñir con la técnica de Gram.

**NOTA:** si se requiere, realizar la tinción de cápsula o de Albert.





- 5) Observar las preparaciones al microscopio utilizando el objetivo 100X.<sup>(4)</sup>



- 6) Realizar la inoculación de las pruebas bioquímicas seleccionadas a partir de las colonias aisladas del medio de cultivo utilizado, de acuerdo al criterio y resultado sugerente al tipo de microorganismo aislado en los mismos.



- 7) Incubar 24 a 48 horas a 35- 37 °C.



- 8) Realizar las lecturas de las pruebas realizadas.<sup>(4)</sup>

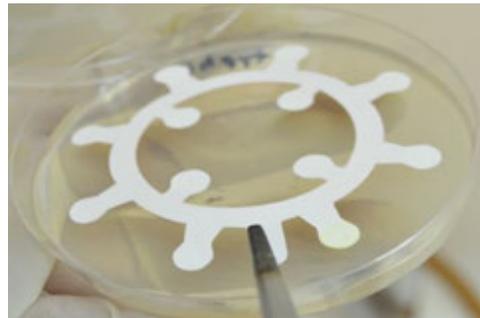


## SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

- 9) Realizar el antibiograma del agente etiológico.



- 10) En una placa de Agar Müeller Hinton inocular en todo el medio el microorganismo identificado, a partir de una colonia aislada y colocar el multidisco.



- 11) Incubar la placa a 35-37 °C por 24 horas.



- 12) Realizar la lectura del antibiograma, utilizando la hoja para sensibilidad a antibióticos. (ANEXO III) <sup>(4)</sup>
- 13) Reportar todos los resultados en los formatos, para tinción, morfología colonial, pruebas bioquímicas y pruebas especiales. (ANEXO I)
- 14) Realizar la discusión de los resultados y las conclusiones.



## B) DESCRIPCIÓN MÉTODO ALTERNATIVO

### SISTEMA API® 20

- 1) Una vez identificado el agente etiológico a partir del cultivo y la observación al microscopio, inocular el sistema API® 20 correspondiente:

 API® 20 Staph: *S. aureus*

 API® 20 E: *B. pertussis*

 API® 20 NH: *H. influenzae*

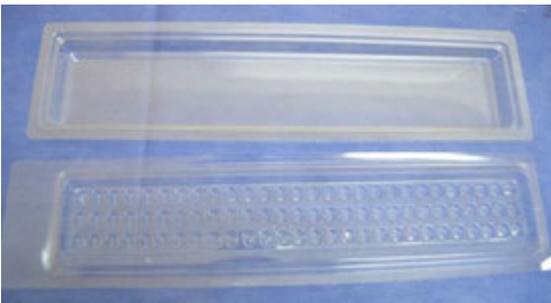
 API® 20 Coryne: *C. diphtheriae*

- 2) Todas las instrucciones para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada uno de los microtubos, y las condiciones de incubación se pueden encontrar claramente especificadas en los instructivos de uso señalados por el fabricante para cada tipo de galería. <sup>(19)</sup>

**NOTA:** para ilustrar esta práctica utilizaremos *S. aureus* como agente etiológico.

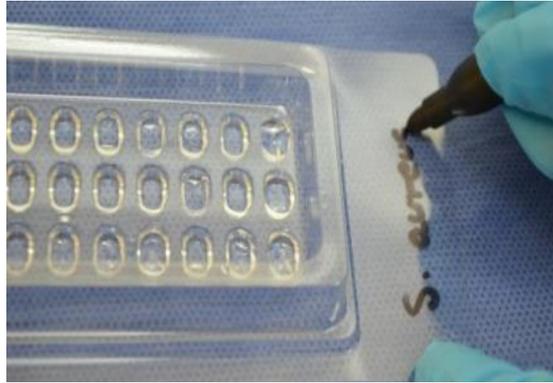
### PREPARACIÓN DE LA GALERÍA

- 3) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como  $Cl_2$ ,  $CO_2$ , etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.





- 4) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).



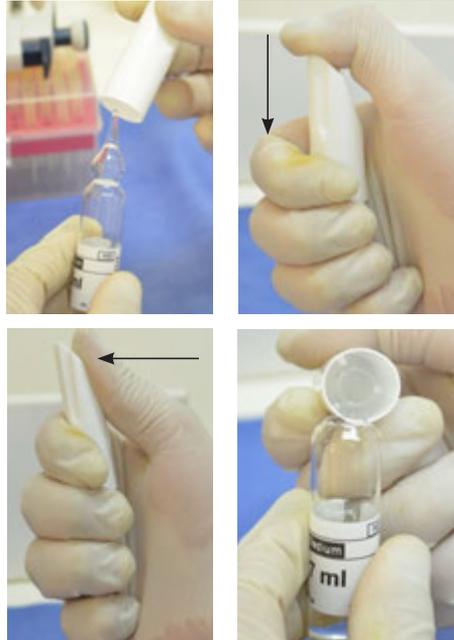
- 5) Sacar una galería API® 20 E de su envase individual y colocar la galería en la cámara de incubación. <sup>(20)</sup>





## PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 6) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Medium (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Medium (5 ml), o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril sin aditivos:
  - a) Introducir la ampolla en el protector de ampolla (tapón blanco).
  - b) Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - c) Presionar a fondo el tapón blanco.
  - d) Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
  - e) Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
  - f) Retirar delicadamente el tapón.
- 7) A partir de la cepa pura o una colonia bien aislada del microorganismo, preparar una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a 0.5 de McFarland.





- 8) Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación. <sup>(20)</sup>



### INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 9) Con ayuda de una pipeta, rellenar la primera mitad de la galería con API Staph Medium. Rellenar solamente los microtubos y no las cúpulas, sin sobrepasar el nivel del tubo. Para evitar la formación de burbujas, inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.



- 10) Crear anaerobiosis en las pruebas ADH y URE rellenando las cúpulas con aceite de parafina para formar un menisco convexo.

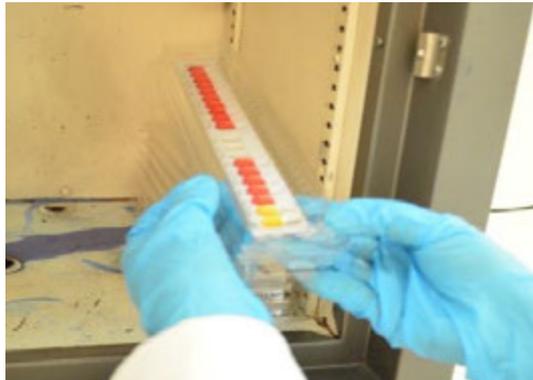




**11)** Cerrar la cámara de incubación.



**12)** Incubar durante 18-24 horas a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . <sup>(20)</sup>



### LECTURA DE LA GALERÍA

**13)** La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO II)

**14)** Después del periodo de incubación, el desarrollo de las reacciones se dará por la adición de 1 gota de cada uno de los siguientes reactivos y a continuación se interpretan todas las reacciones conforme a la tabla de identificación. (ANEXO II)



-  **VP:** Añadir una gota de VP 1 y una de VP 2.  
Positivo: color violeta-rosáceo en 10 minutos.  
Negativo: color rosa pálido o rosa claro después de 10 minutos.
-  **NIT:** Añadir una gota de NIT 1 y una de NIT 2.  
Positivo: color rojo en 10 minutos.  
Negativo: incoloro después de 10 minutos.
-  **PAL:** Añadir una gota de ZYM A y ZYM B (\*).  
Positivo: color violeta en 10 minutos.  
Negativo: incoloro después de 10 minutos.

(\* ) Se recomienda controlar cada ampolla de reactivo ZYM B antes de la primera utilización. <sup>(20)</sup>

**15)** Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato. (ANEXO II)

## INTERPRETACIÓN

**16)** Determinación del perfil numérico

En la hoja de resultados, los ensayos se separan en grupos de 3 y se asigna para cada uno un valor 0, 1, 2 ó 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

-  Si la reacción es negativa se pone 0.



- Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo o 4 si es el tercero.
- Se suman los valores de cada triplete y con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras que constituye el perfil numérico (Cuadro 5).<sup>(20)</sup>

**CUADRO 5.** Determinación del perfil numérico API® 20 STAPH<sup>(20)</sup>

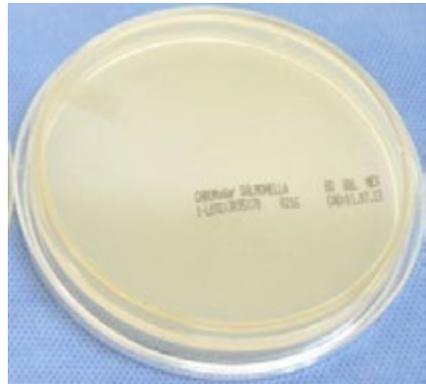
-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	
O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	NLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MEO	NAG	ADB	URE	LSTK
6				7			0		6			1			1			3		
6 706 113 <i>Staphylococcus epidermidis</i>																				

**17)** La identificación se realiza a partir de la base de datos.<sup>(20)</sup>

### MEDIOS CROMOGENICOS

Una vez identificado el agente etiológico y si se tratará de *S. aureus*, inocular el medio cromogénico correspondiente:

 chromID™ MRSA: *S. aureus*\_





18) Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña cercana al borde para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa.



19) Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35-37 °C durante 24 horas en posición invertida. En caso de resultado negativo a las 24 horas, incubar nuevamente durante 24 horas más para registrar los resultados finales.

**NOTA:** Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella, ya que la luz puede destruir los cromógenos. <sup>(4, 21)</sup>



20) Una vez que los colores de las colonias se hayan desarrollado, el agar cromogénico se puede exponer a la luz, para efectuar la lectura de las placas contra un fondo blanco.



**FIGURA 5.** Placa de Agar MRSA en donde se puede observar la identificación de *S. aureus* (colonias verdes). <sup>(21)</sup>



- 21) Anotar el resultado correspondiente en el formato de reporte de resultados. (ANEXO II)
- 22) El medio cromogénico para *S. aureus* permite la detección de:
-  *S. aureus*: colonias de color verde (Figura 5).
  -  Inhibición de otras bacterias no pertenecientes al género y levaduras. <sup>(21)</sup>

## VI.1 Fase Postanalítica

Se refiere a los resultados obtenidos, los cuales se especifican en el informe de laboratorio de forma que sea legible y fácil de comprender. (ANEXO IV) <sup>(10)</sup>

## VI. Referencias

1. Rodríguez Pinto M. Anatomía, Fisiología e Higiene. México:Edelive; 2016.
2. Universidad Nacional Autónoma de México. Exudado Faríngeo. 2016. Recuperado a partir de: <http://procedimientosmicrobiologicos.wikispaces.com/EXUDADO+FAR%C3%8DNGEO>
3. Ingraham JL, Ingraham CA. Introducción a la microbiología. Vol. II. Barcelona: Reverte; 1998.
4. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop P., Schreckenberger P., Woods G. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. 6 ed. Médica Panamericana: Buenos Aires; 2008.
5. Ryan KJ, Ray CG. Microbiología médica. 6 ed. México DF: Mc Graw Hill; 2017.
6. Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, D.C. Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico. Bogotá: Linotipia Bolívar y Cía; 2008. Recuperado de: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/.../Manual%20Toma%20Muestras.pdf>; 2008.



7. Molina López J. Tosferina. Departamento de microbiología y parasitología, Recursos en bacteriología UNAM. México; 2009. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/tosferina.html>
8. Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid: Médica Panamericana; 2006.
9. Collado Otero F. Patología infantil estructurada: bases fisiopatológicas del diagnóstico y tratamiento. Madrid: Norma; 1984.
10. Fernández C, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el laboratorio clínico. Buenos Aires: Panamericana; 2005.
11. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3 ed. Ginebra: OMS; 2005. Recuperado de: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
12. Ministerio de salud pública y asistencia social. Manual para el diagnóstico laboratorial de Bordetella pertussis. El Salvador. 2008. Recuperado de: [http://asp.salud.gob.sv/regulacion/pdf/manual/Manual\\_diagnostico\\_laboratorial\\_bordetella.pdf](http://asp.salud.gob.sv/regulacion/pdf/manual/Manual_diagnostico_laboratorial_bordetella.pdf)
13. Delaat A. Microbiología. 2 ed. México DF: Interamericana; 1983.
14. Todd JC, Sanford AH, Davidson I. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 8 ed. Barcelona: Salvat; 1988.
15. Hernando Moreno A, Gutiérrez López E. Higiene del medio hospitalario y limpieza de material. Madrid: Editex; 2009.
16. Escobedo López AB, Cabrera Maldonado C, Álvarez López JM, Pazos Salazar NJ, Suárez Albores PG, Pérez Fernández MS. Manual de Bacteriología II. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: México; 2002. Recuperado de: [http://www.facultadcienciasquimicas.buap.mx/ligas/acredita/QFB/data/4\\_2%20Curriculum/4.2.10%20Actas%20de%20%C3%A1reas%20Programas%20de%20asig%20y%20Manuales%20Lab/Manuales%20de%20Laboratorio/Microbiolog%C3%ADaLab-pdf/Manual%20Bacteriolog%C3%ADa%20II.pdf](http://www.facultadcienciasquimicas.buap.mx/ligas/acredita/QFB/data/4_2%20Curriculum/4.2.10%20Actas%20de%20%C3%A1reas%20Programas%20de%20asig%20y%20Manuales%20Lab/Manuales%20de%20Laboratorio/Microbiolog%C3%ADaLab-pdf/Manual%20Bacteriolog%C3%ADa%20II.pdf)
17. Cercenado E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica; 2006. Recuperado de:



18. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia23.pdf>
19. López García MJ, Cárdenas Povedano M, Urbano Felices A. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones respiratorias. Barcelona: OmniaScience; 2012.
20. bioMérieux. Sistemas miniaturizados API®. bioMérieux; 2010. Disponible en: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_anexo2.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_anexo2.pdf)
21. bioMérieux. API® 20 Staph, Sistema de identificación de estafilococos, micrococos y géneros relacionados. bioMérieux; 2009. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
22. bioMérieux. Catálogo de medios de cultivo convencionales. México: bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/medios-de-cultivo-convencionales>
23. bioMérieux. API® 20 E, Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes. bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
24. Manual de procedimientos del laboratorio médico de Toronto. System for identification of Neisseria y Haemophilus (API NH). 2000. Disponible en: [http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04\\_04.pdf](http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04_04.pdf)
25. Manual de procedimientos del laboratorio médico de Toronto, Identificación de Corynebacterium (API Coryne). 2000. Disponible en: [http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04\\_01.pdf](http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04_01.pdf)
26. Prats G. Microbiología clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
27. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 ([jalisco.gob.mx](http://jalisco.gob.mx))



# Unidad Aparato Circulatorio

## PRÁCTICA 6 Diagnóstico de infecciones bacterianas del aparato circulatorio mediante el hemocultivo



**Elaborado por:**

Q.F.B. Ana Laura Loreto Pérez

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez



# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>221</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>224</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>225</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>227</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>228</b>
V.1 Fase Preanalítica	228
V.2. Fase Analítica	235
V.3. Fase Postanalítica	267
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>268</b>



## I. Introducción

El sistema circulatorio también llamado sistema cardiovascular transporta fluidos a través del cuerpo; está formado por los sistemas cardiovascular y linfático. El corazón y los vasos sanguíneos configuran la red de transporte de sangre y forman el sistema cardiovascular. A través de este sistema, el corazón bombea la sangre a través del vasto sistema de vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos son las arterias, los capilares y las venas. La sangre transporta nutrientes, oxígeno y productos de desecho de las células. <sup>(1)</sup>

El sistema cardiovascular transporta la sangre desde el corazón a los tejidos y desde estos al corazón. El sistema linfático tiene dos funciones: recoge el fluido perdido de la sangre, retornándolo a través de los vasos linfáticos al torrente circulatorio y colabora en la lucha contra las infecciones microbianas.

De forma ocasional los microorganismos infectan la superficie endotelial de un componente específico del aparato cardiovascular. Estas infecciones intravasculares se denominan **endarteritis** cuando afectan una arteria, **endocarditis** cuando afectan un sitio endotelial en el corazón y **flebitis** si se localiza en la luz de una vena. <sup>(2)</sup>

Las dos categorías principales de infecciones del torrente sanguíneo son las intravasculares (que se originan dentro del sistema cardiovascular) y las extravasculares (que resultan de la entrada de bacterias en la circulación a través del sistema linfático, provenientes de otro sitio de infección).

Los factores que contribuyen con la iniciación de infecciones del torrente sanguíneo son los agentes inmunosupresores, el uso prolongado de antibióticos de amplio espectro que suprime la microbiota y permiten la aparición de cepas de bacterias resistentes, los procedimientos invasivos que permiten el acceso de las bacterias en el interior del huésped, los procedimientos quirúrgicos extensos y la supervivencia prolongada de pacientes debilitados y con enfermedades graves.

La septicemia es un síndrome clínico caracterizado por fiebre, temblores, taquicardia, hiperventilación y toxicidad o postración, que se produce cuando una bacteria circulante se multiplica a una tasa que excede la remoción por fagocitos.



La bacteriemia o la fungemia se caracterizan por la presencia de microorganismos vivos en la sangre, según se demuestra por un hemocultivo positivo. Estos dos términos no describen el estado clínico, que varía desde asintomático hasta una enfermedad leve o grave. <sup>(3, 4)</sup>

La bacteriemia o bacteremia se puede definir como:

-  **Transitoria** (un único episodio con una duración inferior a 20 minutos).
-  **Intermitente:** implica la manipulación de una zona extravascular, como un absceso por *S. aureus*, en la que las bacterias se introducen en los vasos linfáticos en diferentes momentos y, desde este punto, alcanzan la sangre.
-  **Continua:** implica un origen intravascular, se presenta en casos en que microorganismos tienen acceso directo al torrente sanguíneo y la endocarditis constituye el ejemplo más importante, seguido de fístulas arteriovenosas infectadas, catéteres intraarteriales, cánulas permanentes.

Las bacteriemias y fungemias se diagnostican por hemocultivo, que consiste en el cultivo de una muestra de sangre en medios adecuados para recuperar las bacterias y los hongos adecuados que son capaces de crecer en medios artificiales. <sup>(5)</sup>

Los hemocultivos se pueden clasificar según el tipo de paciente, pues los microorganismos son distintos en pacientes inmunosuprimidos o inmunocompetentes, adultos o pediátricos, que estén o no bajo terapia antibiótica; según la toma de la muestra, pueden ser clasificados en hemocultivos periféricos o centrales (obtenidos a través de un catéter venoso central).

También pueden clasificarse según el tipo de microorganismos que se esté investigando, ya que se requieren distintos sistemas de hemocultivos si se sospechan bacterias aeróbicas, anaeróbicas, fastidiosos, micobacterias, hongos o virus. Por último, se pueden clasificar según la metodología de los distintos sistemas de hemocultivos en métodos convencionales (manuales), en sistemas semiautomatizados (lisis-centrifugación) o en sistemas automatizados (BACTEC, BacT/Alert, Septichek, etcétera).

Sistemas de hemocultivos. Diferentes métodos tienen distintos rendimientos en cuanto a sensibilidad y rapidez en la detección de las bacterias en el torrente sanguíneo. En general existen 3 tipos de sistemas de hemocultivos:



-  Manuales o convencionales
-  Semiautomatizados: lisis-centrifugación.
-  Automatizados

Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Fase preanalítica:** es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma. Se indica las propiedades de los reactivos que serán empleados, y en este caso la correcta manipulación de las cepas puras, más representativas a utilizar para esta práctica.

**Fase analítica:** se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados y reactivos. El control de estos sistemas se establece, y se describen las especificaciones y características de los instrumentos, sus normas de funcionamiento, calibración, o bien se hace referencia al manual de instrucciones del fabricante. Se explica ampliamente como realizar un examen directo para poder efectuar una interpretación, de igual manera se explican las propiedades de los medios cultivos selectivos, diferenciales, de transporte, medios de enriquecimiento y pruebas bioquímicas y especiales. También se explica los métodos alternativos de diagnóstico como el sistema API 20 y el uso de los medios cromogénicos.

**Fase postanalítica:** se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

Sin embargo, aún establecidas estas tres etapas en escrito, el control de calidad es responsabilidad de la persona a cargo del área de microbiología, que debe asegurarse de que las pruebas realizadas sean procesadas con calidad y de que los resultados sean confiables, reproducibles y tan exactos como sea posible, siguiendo los procedimientos establecidos. Los



resultados se deben de entregar en un informe que sea legible y fácil de comprender. <sup>(6)</sup>

En el presente trabajo se establecen los métodos tradicionales y métodos alternativos de diagnóstico (sistema API 20 y medios cromogénicos) empleados para el diagnóstico microbiológico de microorganismos encontrados frecuentemente en septicemias.

Debido a que no se cuenta con prácticas desde el punto de vista anatómico, es decir, prácticas que permitan el diagnóstico de microorganismos que causan patologías en aparatos y sistemas del cuerpo humano. Para ello, se pretende diseñar prácticas con un formato novedoso y entendible, siguiendo los criterios de control de calidad. Estas prácticas están encaminadas al diagnóstico microbiológico de microorganismos causantes de patologías diversas, con el objeto de una mejor comprensión de la identificación de los microorganismos por género y especie.

Cabe señalar que al final de la práctica se encuentra un cuestionario que tiene por objetivo validar la utilidad de la misma, que con las opiniones de alumnos y profesores establecen un proceso de mejora continua de esta práctica.

## II. Objetivos

-  Utilizar los procedimientos de los métodos tradicional y alternativo de diagnóstico microbiológico para la identificación de microorganismos encontrados frecuentemente en septicemias.
-  Utilizar sistema API 20 y medios cromogénicos como métodos alternativos de diagnóstico.
-  Utilizar cepas puras de bacterias (frecuentemente encontradas en septicemias: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*) como control de calidad en los métodos tradicional y alternativo de diagnóstico.



### III. Medidas de bioseguridad

De acuerdo con la publicación de la OMS en 2005 se hace referencia a los peligros relativos que entrañan los microorganismos clasificándolos por grupos de riesgo. Y esta clasificación se utiliza exclusivamente para el trabajo de laboratorio. Existe una relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad y con ello la clasificación del tipo de laboratorio y el equipo de seguridad.

La asignación de un nivel de bioseguridad tiene en consideración el microorganismo (agente patógeno) utilizado, las instalaciones disponibles, el equipo, las prácticas para trabajar con seguridad en el laboratorio (**Cuadro 1**). Por ello el nivel de bioseguridad que tiene el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la FES Zaragoza es nivel 1.

**CUADRO 1.** Relación del grupo de riesgo con el nivel de bioseguridad, las prácticas y el equipo. <sup>(11)</sup>

Grupo de riesgo	Nivel de bioseguridad	Tipo de laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipo de seguridad
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación.	Técnicas microbiológicas apropiadas.	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto.

Grupo de riesgo 1 (riesgo individual y poblacional escaso o nulo): microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o en animales.

Cada laboratorio debe adoptar un manual de seguridad o de trabajo en el que identifiquen los riesgos conocidos y potenciales y se especifiquen las prácticas y los procedimientos encaminados a eliminar o reducir al mínimo esos riesgos.

A continuación, se mencionan algunos aspectos importantes en cuanto a las medidas de bioseguridad.



### Protección personal:

-  Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
-  Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos (**Figura 1**).
-  El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
-  Se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
-  Estará prohibido usar prendas protectoras fuera de laboratorio.
-  En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
-  La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios o taquillas que la ropa



**FIGURA 1.** Protección personal.



**Zonas de trabajo del laboratorio:**

- 🔬 El laboratorio se mantendrá ordenado y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- 🔬 Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso, al inicio y al final de cada jornada de trabajo. <sup>(7)</sup>

**Manipulación de desechos:**

- 🔬 Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. <sup>27</sup>



## **IV. Propósito del examen**

Esta práctica está encaminada al diagnóstico microbiológico de microorganismos encontrados frecuentemente en septicemias. Se utilizarán dos métodos: método tradicional y un método alternativo de diagnóstico (medios cromogénicos y sistema API 20), empleando cepas puras de bacterias frecuentemente encontradas en septicemias, que se considerarán como control de calidad en ambos métodos. Con el objetivo de conocer los fundamentos y pasos a seguir de los mismos. Por último y de manera significativa se pretende mejorar el proceso de enseñanza y aprendizaje, así como mejorar la preparación académica de los alumnos que cursan el módulo de laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas. Así mismo, los alumnos tendrán los conocimientos básicos teóricos y prácticos necesarios para cada una de las etapas de control de calidad en esta práctica.



## V. Metodología

Se utilizarán dos métodos: método tradicional y el método alternativo de diagnóstico (sistema API 20 y medios cromogénicos). Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

En esta primera sección de la metodología se hará mención de la fase preanalítica. La fase preanalítica es importante, y de ella depende en gran medida el resultado final. Aquí se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma.

### V.I. Fase Preanalítica

#### INDICACIONES Y PRECAUCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA

-  Explicar al paciente sobre el procedimiento a realizar.
-  Efectuar siempre la extracción de sangre antes de iniciar la terapia antibiótica.
-  En pacientes en los que ya se haya iniciado el tratamiento antibiótico y en los que no se considere conveniente retirarlo, deberá realizarse la extracción justo antes de la administración de una dosis.
-  Sin embargo, que un paciente haya estado recibiendo antibióticos no necesariamente impide la obtención de muestras, aunque ésta debe tenerse en cuenta cuando se interpretan los resultados de los cultivos.



**EQUIPO Y REACTIVOS**

MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REACTIVOS PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Cubreobjetos</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Mechero</li> <li>• Jeringa 10 ml con aguja</li> <li>• Tintura de yodo al 3%</li> <li>• Torundas con alcohol al 70%</li> </ul>	Colorantes para tinción de Gram: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristal violeta</li> <li>• Lugol</li> <li>• Alcohol-Cetona</li> <li>• Safranina</li> </ul> Colorantes para tinción de cápsula. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rojo congo</li> <li>• Mordiente de cápsula</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frascos con medio de Ruiz Castañeda</li> <li>• ASC 5%</li> <li>• McConkey</li> <li>• Sal y manitol</li> <li>• Sabouraud.</li> <li>• Cetrimida</li> <li>• Agar Müller Hinton</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citrato de Simmon's</li> <li>• Fenilalanina desaminasa</li> <li>• LIA</li> <li>• MIO</li> <li>• SIM</li> <li>• TSI</li> <li>• Urea de Christensen</li> <li>• Caldo nitrato</li> <li>• Caldo nitrato con campana</li> <li>• Caldo RM-VP</li> <li>• O/F Hugh Leifson con/sin sello de nujol</li> <li>• Rojo de fenol + CHO's</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fenilalanina desaminasa</li> <li>• Indol</li> <li>• Caldo nitrato</li> <li>• RM-VP</li> </ul>
				<b>CEPAS</b>
				<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>C. albicans</i></li> <li>• <i>S. aureus</i></li> <li>• <i>E. coli</i></li> <li>• <i>P. aeruginosa</i></li> </ul>

**PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA**

Se deben seguir las indicaciones establecidas en el procedimiento para la toma de la muestra, de igual manera es de suma importancia los puntos mencionados en indicaciones y preocupaciones para la toma de la muestra.

Para reducir las posibilidades de microorganismos contaminantes de la piel, los sitios de punción venosa se preparan como sigue:



- 1) Antes y después de cada procedimiento lavarse las manos correctamente.



- 2) El personal de laboratorio deberá usar bata (a fin de evitar que la ropa de calle se pueda contaminar o ensuciar), guantes y cubreboca.

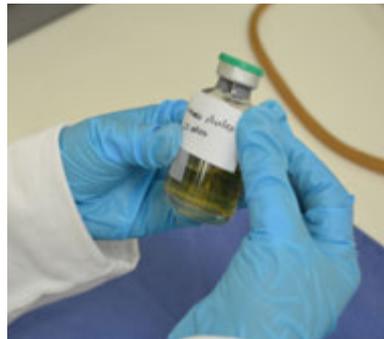
(11)



- 3) Etiquetar el medio del transporte con los datos del paciente. (11, 12, 14)



- 4) Cada frasco debe rotularse (nombre del paciente, sexo y edad).





- 5) Retirar los tapones externos de los frascos y desinfectar los tapones de goma con alcohol al 70%, dejar secar.



- 6) Localizar por palpación la vena a puncionar.



- 7) Aplicar tintura de yodo al 3% o yodo povidona en el sitio a puncionar y permitir secar durante 1 o 2 minutos. \*

\*En el caso que el paciente sea alérgico al yodo, se aplicará 2 veces alcohol al 70% para realizar una correcta antisepsia.





- 8) Remover el exceso de yodo con alcohol al 70%.



- 9) Extraer la sangre sin tocar el campo desinfectado, si fuese necesario palpar la vena, deberá desinfectarse la zona nuevamente y los dedos.



- 10) Extraer sangre de dos sitios diferentes, si es posible de ambos brazos, siguiendo los mismos pasos de antisepsia. (Pasos 6-9).

**Tomando en cuenta lo siguiente:**



Volumen de sangre por frasco HEMO-CHEK

Realizar la toma de muestra considerando de 1 a 3 ml para frascos de 20 ml y de 4 a 7 ml para frascos de 50 ml.





- 11) Introducir la sangre en los frascos evitando que entre aire en el frasco anaerobio y de manera cuidadosa para evitar la hemólisis (se inoculará en primer lugar el frasco anaerobio).



- 12) Mover los frascos para que la sangre se mezcle con el medio de cultivo.



- 13) Realizar una suspensión bacteriana (con la cepa pura) con solución fisiológica e inocular con una pequeña cantidad a los frascos de hemocultivo. **Nota:** Esto se realizará para simular una infección, y ejercitar la toma de muestra y el proceso de diagnóstico en la identificación de un agente patógeno causante de bacteriemias.

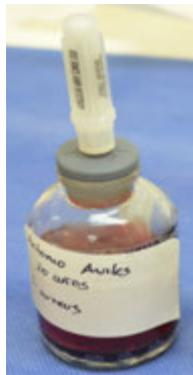




- 14)** Colocar la unidad ventiladora en los frascos para hemocultivo, quitando la tapa blanca, introducir la aguja corta a través del tapón del frasco. En caso de que los cultivos sean aerobios se retira el capucho de plástico transparente y volver a colocarlo, como se indica en las siguientes figuras.



- 15)** Para los medios anaerobios no se retira el capuchón transparente.



- 16)** Colocar los frascos en posición vertical e incubar a 37 °C y observar cada 24 horas, si hay turbidez en la fase líquida.



## V.2. Fase Analítica

En esta fase se describen los métodos: tradicional (A) y el método alternativo de diagnóstico (B), los cuales son explicados a manera de resumen en la siguiente tabla (Tabla 2), mostrando el procedimiento a seguir para el diagnóstico microbiológico a partir de muestra clínica o partiendo de cepas puras. Posteriormente ambos métodos (A y B) serán detallados de forma clara, precisa y sencilla.

**TABLA 2.** Procedimiento del método: tradicional y alternativo de diagnóstico.

Método tradicional		Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
<p>Observación semanal: si hay cambios en la fase sólida y líquida de los frascos.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Obtener una pequeña cantidad de muestra de los frascos de hemocultivo con una jeringa para los análisis posteriores*</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>*Realizar frotis y realizar tinción de Gram: Examen microscópico utilizando objetivos 40X y 100X</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>*Realizar resiembras en los medios de cultivo: ASC 5%, McConkey, Sal y Manitol, Sabouraud y Cetrimida.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar placas a 37 °C, 24 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Describir morfología colonial de cada uno de los medios inoculados.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Hacer pruebas diferenciales según la morfología microscópica y colonial con pruebas bioquímicas.</p>	<p>Realizar las siguientes actividades:</p> <p><b>*Manejo de medios cromogénicos</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 24 hrs.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Observar colonias después de la incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p><b>Manejo del sistema API 20:</b></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>A partir de una colonia aislada, realizar una suspensión con agua estéril, obtener una turbidez equivalente a 0.5 McFarland (API 20 STAPH).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Llenar con la suspensión de bacterias los microtubos, no las cúpulas.</p>		



Método tradicional		Método alternativo	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
		<p style="text-align: center;">↓</p> <p>Llenar la cúpula de los pocillos ADH y URE con aceite mineral.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Colocar agua en panal de pocillos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Cerrar las cámaras de incubación.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar a <math>36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}</math> durante 18-24 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, determinadas pruebas requieren ser reveladas: VP, NIT y PAL</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo (con las tablas de lectura que proporciona el proveedor).</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>La identificación se obtiene a partir del perfil numérico.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>(Ver procedimiento de API20E y API20AUX)</p>	

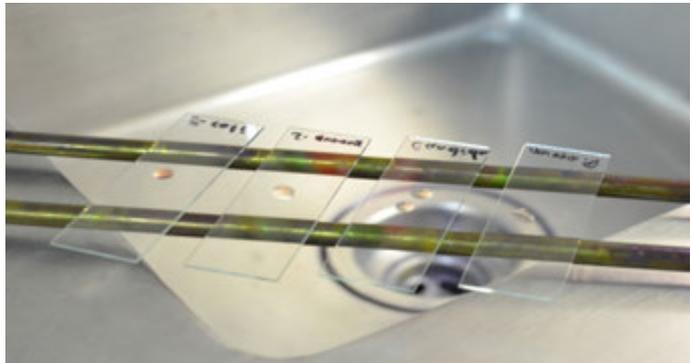
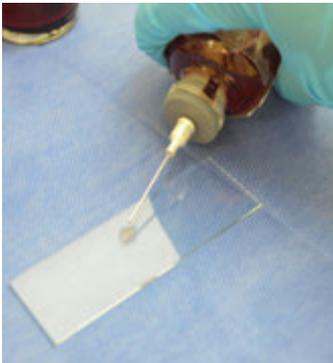


### **A) DESCRIPCIÓN MÉTODO TRADICIONAL**

- 1)** Observar diariamente el aspecto macroscópico en busca de signos que indiquen desarrollo bacteriano: hemólisis, turbidez, presencia de gas, colonias, formación de película y coágulo.

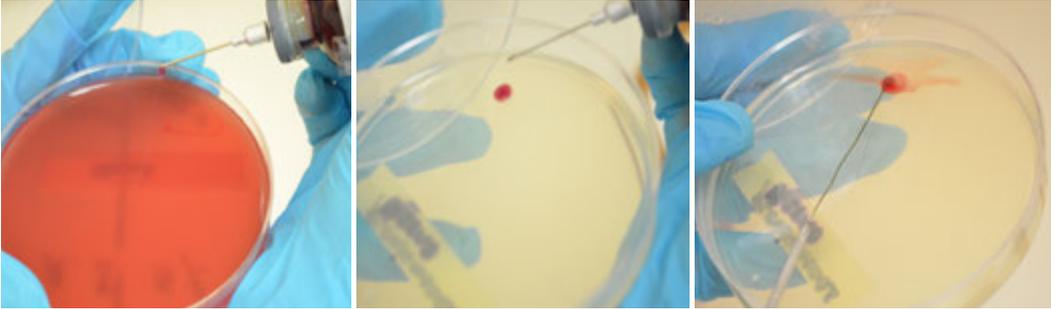


- 2)** En caso de que aparezcan cambios en el medio, realizar un frotis colocando una pequeña muestra con la unidad ventiladora (quitar el capuchón transparente) de cada uno de los frascos para hemocultivo y teñir con la técnica de Gram. Siempre trabajar al lado del mechero.





- 3) Realizar resiembras, colocando una pequeña muestra en cada uno de los medios de cultivo (McConkey, ASC 5%, Sal y Manitol, Sabouraud y Cetrimida).

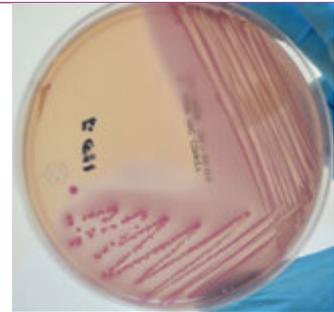
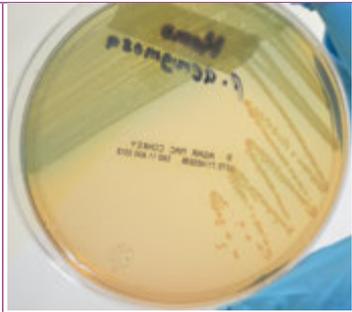
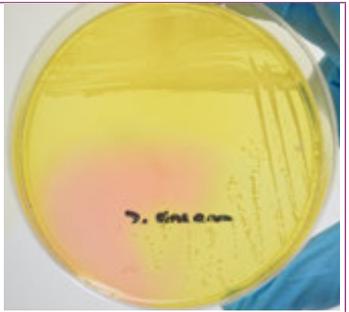
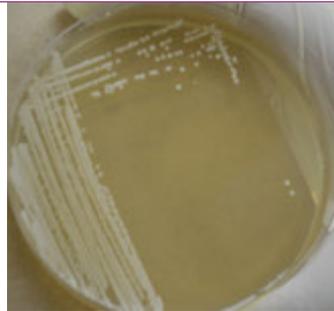


- 4) Incubar las placas a 37 °C durante 24 horas.

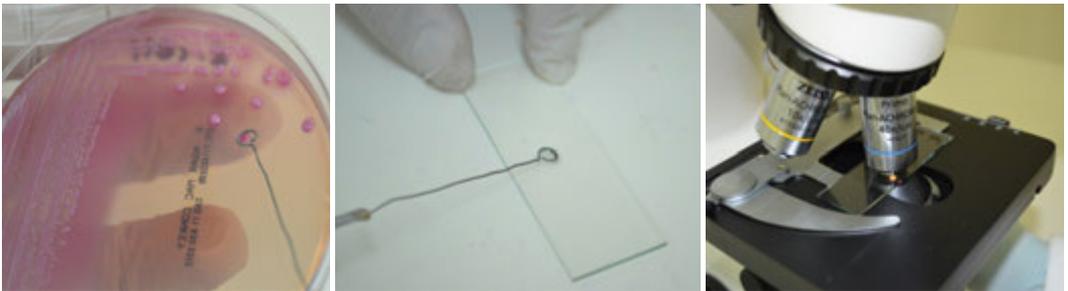


- 5) Observar las características más relevantes de la morfología colonial en cada uno de los medios inoculados, a fin de seleccionar el crecimiento del posible patógeno.



		
<b>Cepas inoculadas en medios: Agar McConkey</b>		<b>Agar Sal y manitol</b>
1- <i>E. coli</i>	2- <i>P. aeruginosa</i>	3- <i>S. aureus</i>
		<b>ASC 5%</b> 6- <i>E. coli</i> / <i>S. aureus</i> 7- <i>C. albicans</i> / <i>P. aeruginosa</i>
<b>Agar Sabouraud</b>	<b>Agar Cetrimida</b>	
4- <i>C. albicans</i>	5- <i>P. aeruginosa</i>	

**6)** Realizar tinción de Gram de los medios inoculados. Observar la preparación en el microscopio, utilizando objetivos 10X y 40X.





- 7) Realizar la inoculación en las pruebas bioquímicas, a partir de colonias bien aisladas de los medios de cultivo utilizados, de acuerdo al criterio y resultado sugerente al tipo de microorganismo aislado en los mismos.



- 8) Reportar todos los resultados en los formatos, para tinción, morfología colonial, pruebas bioquímicas y pruebas especiales. (ANEXO I)
- 9) Realizar una discusión de los resultados y conclusiones, con ayuda de la tabla de identificación de pruebas bioquímicas. (ANEXO I)

## B) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO

### MEDIOS CROMOGÉNICOS

#### METODOLOGÍA

MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO: AGAR CROMOGÉNICO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Asa bacteriológica</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	-----	<ul style="list-style-type: none"><li>• SAID</li><li>• CPS</li><li>• CAN2</li></ul>



- 1) Colocar una pequeña cantidad de la muestra que se obtuvo del frasco de hemocultivo con la jeringa, en la superficie de los medios cromogénicos (para *S. aureus* y *P. aeruginosa*) para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa bacteriológica.



- 2) Incubar las placas en atmósfera aerobia a  $35 \pm 2$  °C durante 20-24 hrs en posición invertida.



- 3) Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella, ya que la luz puede destruir los cromógenos.
- 4) Una vez que los colores de las colonias se hayan desarrollado, el agar cromogénico se puede exponer a la luz, para efectuar la lectura de las placas contra un fondo blanco.
- 5) Anotar el resultado correspondiente en el formato de reporte de resultados. **(ANEXO I)**



Muestra de frasco de hemocultivo inoculada en medios:

**SAID**

1- *S. aureus*

**CPS**

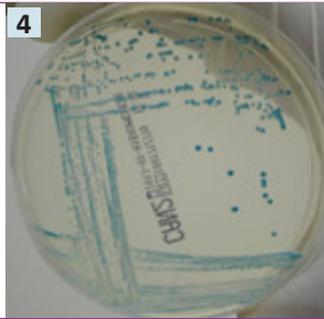
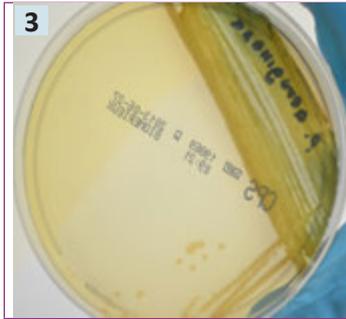
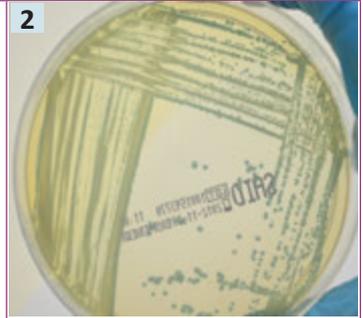
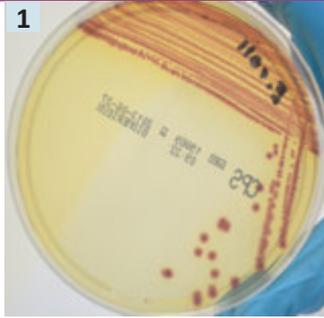
2- *E. coli*

3- *S. aureus*

4- *P. aeruginosa*

**CAN2**

5- *C. albicans*



6) Interpretación de los resultados: Identificación inmediata y directa de los microorganismos más habituales tras 18-24 horas de incubación

El medio cromogénico para *S. aureus* permite la detección de:

-  *S. aureus* produce colonias de color verde. Basada en el desarrollo espontáneo del color verde de las colonias productoras de glucosidasa.
-  *S. epidermidis* (colonias blancas).
-  *S. saprophyticus* (colonias rosas).
-  *S. xylosus* (colonias malva).
-  Inhibición de otras bacterias (Gram+ y Gram-) y levaduras. <sup>(8)</sup>



**En el medio cromogénico CPS permite la detección de:**

-  *K. pneumoniae*: colonias verdes.
-  *P. aeruginosa*: colonias pigmentadas (marrón-amarillas).
-  *E. coli*: colonias rosas-borgoña.
-  *P. mirabilis*: colonias café claro.
-  *Staphylococcus aureus*: colonias amarillas.
-  *Candida albicans*: colonias blancas.
-  *Streptococcus agalactiae*: colonias violetas.
-  Enterococos: colonias turquesas.

**En el medio cromogénico Candida ID permite la identificación de:**

Identificación directa de *C. albicans* = Colonias azules (lectura en 24 - 48 horas)

Mayor intensidad para las colonias de *C. albicans*.

-  Óptima diferenciación en cultivos mixtos.
-  Orientación en la identificación de otras especies de *Candida* (*C. tropicalis*, *C. lusitanae* y *C. kefyr*) = colonias rosas.
-  La nueva fórmula mejora la selectividad (inhibición de bacterias).



## MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO

### API 20 STAPH

#### METODOLOGÍA

MATERIAL	REACTIVOS PARA REVELADO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Micropipeta</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• VP1</li><li>• VP2</li><li>• NIT1</li><li>• NIT2</li><li>• ZYM A</li><li>• ZYM B</li></ul>	-----

#### PREPARACIÓN DE LA TIRA

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.





- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).

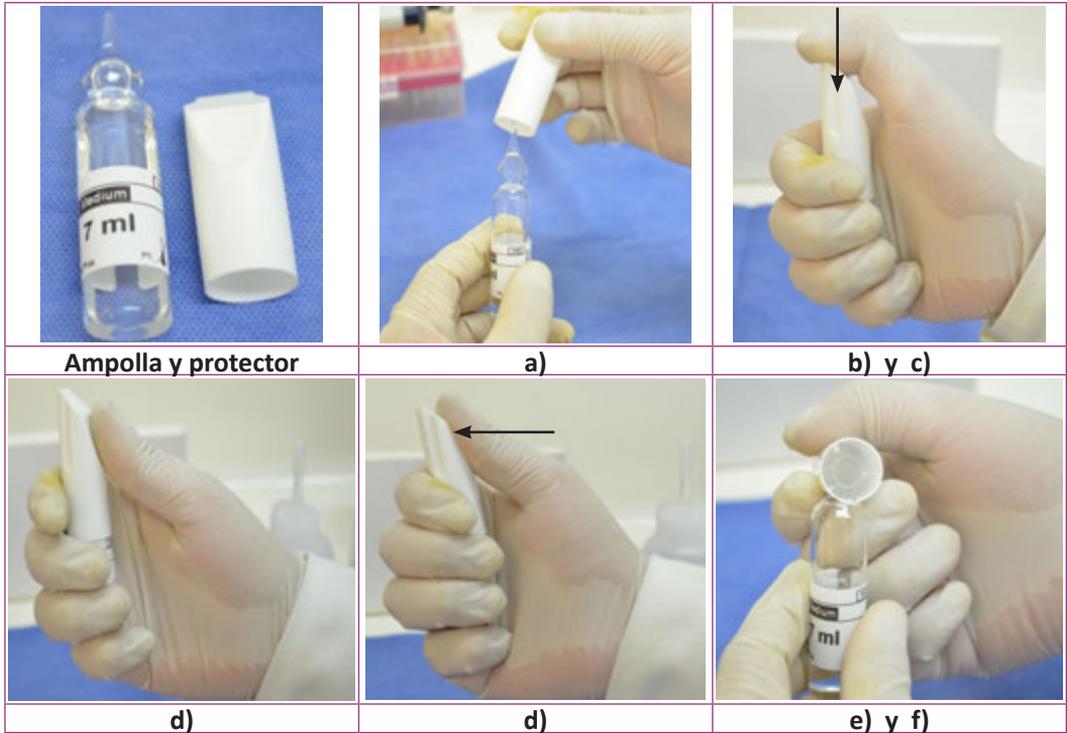


- 3) Sacar una galería API Staph de su envase individual y colocar la galería en la cámara de incubación.



### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 4) Abrir una ampolla de API Staph Médium:
- Introducir la ampolla en el protector de ampolla.
  - Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - Presionar a fondo el tapón blanco.
  - Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
  - Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
  - Retirar delicadamente el tapón.



- 5) A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, preparar una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a 0.5 McFarland. Se recomienda utilizar cultivos jóvenes (18-24 horas). Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.





### INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

6) Con la ayuda de una pipeta, rellenar la galería con API Staph Médium. Rellenar solamente los microtubos y no las cúpulas, sin sobrepasar el nivel del tubo. Para evitar la formación de burbujas, inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.



7) Crear anaerobiosis en las pruebas de ADH\* y URE\*, llenando las cúpulas con aceite mineral para formar un menisco convexo.



ADH\* = Arginina dehidrolasa.

URE\* = Ureasa.

8) Cerrar la cámara de incubación.





- 9) Incubar durante 18-24 horas a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### LECTURA DE LA GALERÍA

- 10) Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO II).



- 11) Después del periodo de incubación, el desarrollo de las reacciones se dará por la adición de 1 gota de cada uno de los siguientes reactivos y a continuación se interpretan todas las reacciones conforme a la tabla de identificación:



**Prueba VP:** Reactivos VP 1 y VP 2:

Esperar 10 minutos. Un color violeta-rosáceo indica una reacción positiva.

Un color rosa pálido o rosa claro obtenido después de 10 minutos debe ser considerado como negativo.



**Prueba NIT:** Reactivos NIT 1 y NIT 2.

Esperar 10 minutos. Un color rojo indica una reacción positiva.



**Prueba PAL:**

Reactivos ZYM A y ZYM B (\*).

Esperar 10 minutos. Un color violeta indica una reacción positiva.

(\*) Se recomienda controlar cada ampolla de reactivo ZYM B antes de la primera utilización.





### DETERMINACIÓN DEL PERFIL NUMÉRICO E IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

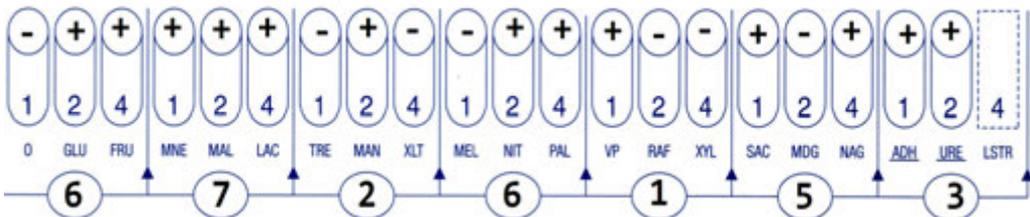
12) En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de 3. Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 o 4, de acuerdo a los siguientes criterios:



- Si la reacción es negativa se pone 0.
- Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo, 4 si es el tercero.

Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata. <sup>(3, 5, 9)</sup>

13) Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato. (ANEXO II)





 <p>O GLU FRU</p>	 <p>MNE MAL LAC</p>	 <p>TRE MAN XLT</p>
 <p>MEL NIT PAL</p>	 <p>VP RAF XYL</p>	 <p>SAC MDG NAG</p>
 <p>ADH URE</p>	<p><b>PERFIL NUMÉRICO DE 7 CIFRAS:</b> 7144552</p> <p><b>IDENTIFICACIÓN:</b></p>	

**API 20E**

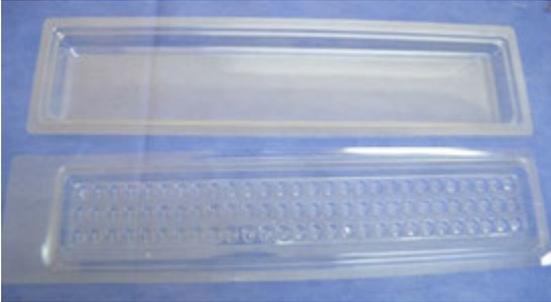
**METODOLOGÍA**

MATERIAL	REACTIVOS PARA REVELADO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropipeta</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FeCl<sub>3</sub> 10% (TDA)</li> <li>• KOH al 40% (VP1)</li> <li>• Naftol (VP2)</li> <li>• Kovacs o dimetilamino-cinamaldehído o reactivo de James.</li> <li>• Tetrafenilendiamina</li> <li>• NIT 1 y NIT 2</li> <li>• Zn</li> </ul>	<p>-----</p>

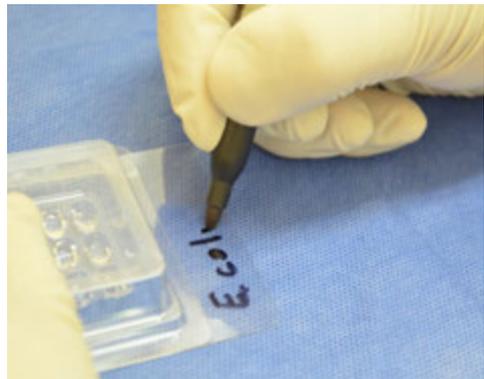


## PREPARACIÓN DE LA TIRA

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.



- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).

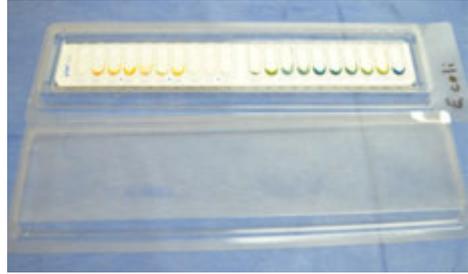


- 3) Sacar una galería API 20E de su envase individual.





- 4) Colocar la galería en la cámara de incubación.

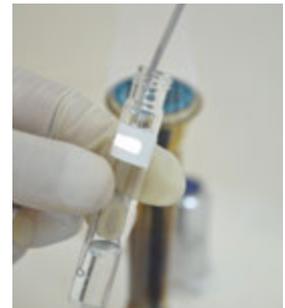


### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 5) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Medium (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Médium (5 ml) o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.



- 6) A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, hacer una suspensión en 5 ml de solución salina (0.85% de NaCl) o 5 ml de agua estéril. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).





## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 7) Con la ayuda de la micropipeta, introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos, colocar la punta de la micropipeta sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia delante.



- 8) Llenar el tubo y la cúpula de los pocillos CIT\*, VP\*, GEL\* con la suspensión de bacterias evitando la formación de burbujas y apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula. Cada cúpula se llena hasta obtener un nivel horizontal o ligeramente convexo, nunca cóncavo para generar resultados correctos.



\*CIT= utilización del citrato

\*VP= producción de acetoina (Voges Proskauer)

\*GEL= gelatinasa (gelatina)



**9)** Para las otras pruebas, llenar únicamente los tubos (no las cúpulas).



**10)** Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos cubrir con parafina las cúpulas de las pruebas ADH\*, LDC\*, ODC\*, URE\*, H2S\* para obtener anaerobiosis.



**11)** Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación y cerrar las cámaras de incubación.



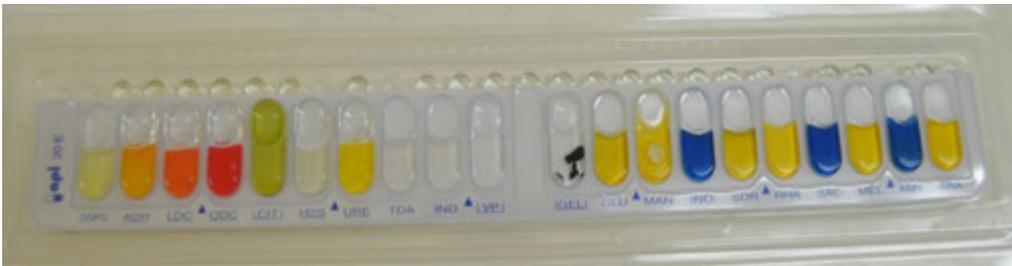


12) Incubar a 37 ° C durante 18-24 horas.



### LECTURA E INTERPRETACIÓN

13) Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de Lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO II)



Determinadas pruebas requieren ser reveladas, para el revelado se tienen que tener en cuenta dos criterios:

- Si la glucosa da negativo y los test positivos son dos o menos de dos, no hay que añadir reactivos.
- Si la glucosa es positiva y/o tres o más test son positivos se revelan los test que requieren reactivos:



**TDA:** añadir una gota de  $\text{FeCl}_3$  10% (una gota del reactivo TDA)

Positivo= color marrón oscuro



**VP:** añadir una gota del reactivo VP1 y una gota del reactivo VP2

Positivo = color rosa fuerte o rojo en 5-10 minutos.

Negativo = color rosa débil después de los 10 minutos.



**IND:** añadir una gota de reactivo de Kovacs<sup>1</sup> o dimetilamino-cinamaldehído<sup>2</sup>. O reactivo de James<sup>3</sup> Dependiendo del reactivo utilizado pueden darse las posibilidades siguientes:

<sup>1</sup>Positivo = aparece un anillo rosa-rojo

<sup>2</sup>Positivo = color de rosa a morado en todo el pocillo

<sup>3</sup>Positivo = rosa





**Reducción de los nitratos en nitritos (NO<sub>2</sub>) y en nitrógeno (N<sub>2</sub>):** añadir una gota de los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos.

Positivo (NO<sub>2</sub>)= coloración roja

Negativo= coloración amarilla, puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de micro-burbujas): agregar de 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula GLU. Después de 5 minutos, si el color sigue siendo **amarillo**, indica una reacción **positiva** (N<sub>2</sub>)

Negativo= coloración naranja-rojizo de la cúpula, ya que los nitratos aún presentes en el tubo han sido reducidos a nitritos por el Zinc.



**Oxidasa:** es la prueba número 21 y se realiza de forma independiente a la tira. Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

Positivo= color azul que aparece inmediatamente.



- 15)** Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa).

Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 o 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

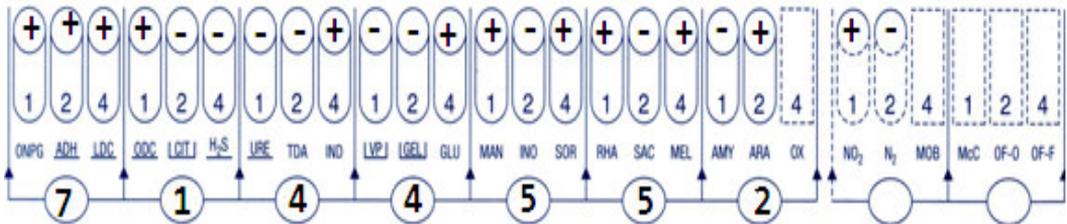


-  Si la reacción es negativa se pone 0.
-  Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo, 4 si es el tercero.
-  Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata. <sup>8, 9, 10</sup>

- 16)** Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato. (ANEXO II)



 <p>ONPG ADH LDC</p> <p>ONP GADH LDC</p>	 <p>ODC [CIT] H2S</p> <p>ODC CIT H2S</p>	 <p>URE TDA IND</p> <p>URE TDA IND</p>
 <p>[VP] [GEL] GLU</p> <p>VP GEL GLU</p>	 <p>MAN INO SOR</p> <p>MAN INO SOR</p>	 <p>RHA SAC MEL</p> <p>RHA SAC MEL</p>
 <p>AMY ARA OX NO2 N2</p> <p>AMY ARA OX NO2 N2</p>	<p><b>PERFIL NUMÉRICO DE 7 CIFRAS:</b> 7144552</p> <p><b>IDENTIFICACIÓN:</b></p>	





## MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO

### API 20C AUX

#### METODOLOGÍA

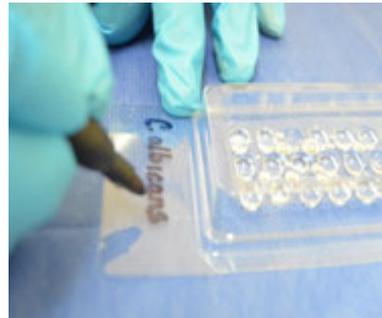
MATERIAL	REACTIVOS PARA REVELADO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micropipeta</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> </ul>	-----	-----

#### PREPARACIÓN DE LA TIRA

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.

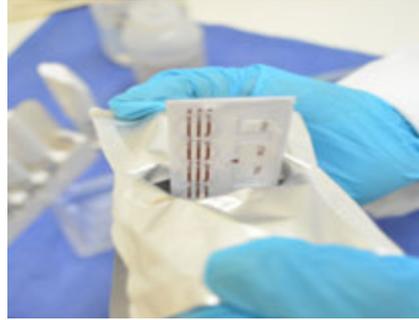


- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).

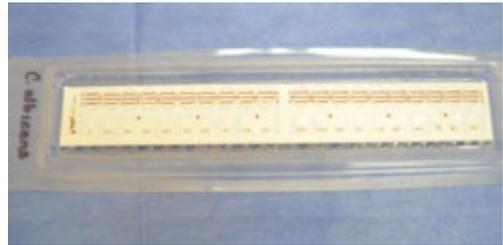




- 3) Sacar una galería API 20 Aux de su envase individual.

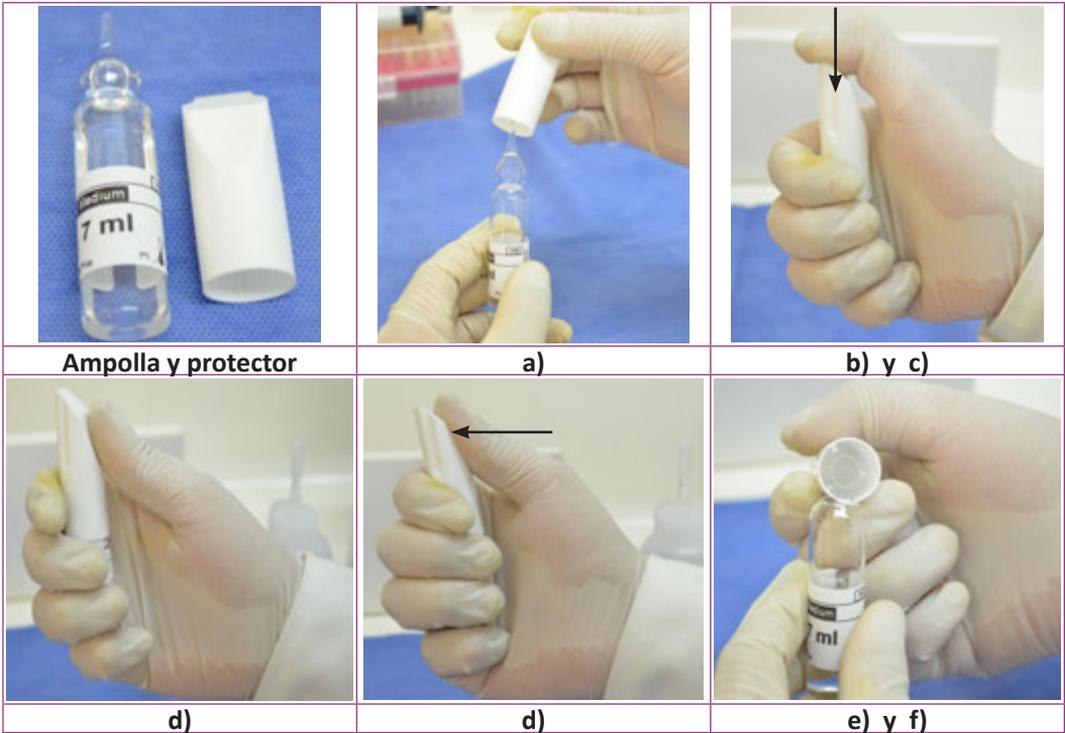


- 4) Colocar la galería en la cámara de incubación.



### **PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

- 5) Abrir una ampolla de API 20 Aux:
- a) Introducir la ampolla en el protector de ampolla.
  - b) Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - c) Presionar a fondo el tapón blanco.
  - d) Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
  - e) Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
  - f) Retirar delicadamente el tapón.



- 6)** A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland. Se recomienda utilizar cultivos jóvenes (18-24 horas). Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.



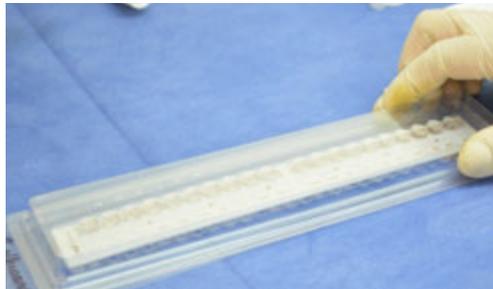


## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 7) Con la ayuda de la micropipeta, transferir 100 microlitros (2 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar evitando la formación de burbujas. Llenar las cúpulas con la suspensión evitando la formación de burbujas y apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula.

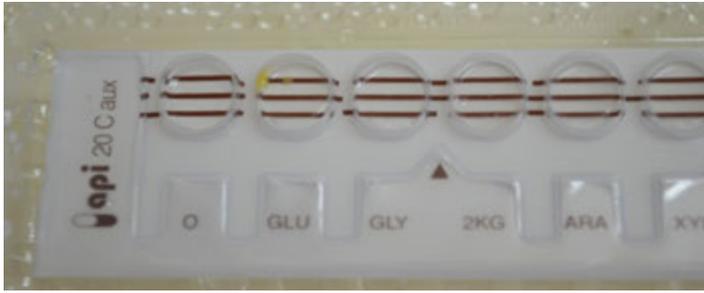


- 8) Cerrar las cámaras de incubación. E Incubar a 30 °C durante 24-72 horas.



## LECTURA DE LA GALERÍA

- 9) Tras la incubación observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula del control negativo. Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO I)



### DETERMINACIÓN DEL PERFIL NUMÉRICO E IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

**10)** Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes.

Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 o 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

-  Si la reacción es negativa se pone 0.
-  Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete (si hay presencia de turbidez o crecimiento de levaduras en el pocillo), 2 si es el segundo, 4 si es el tercero.
-  Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata. <sup>(9)</sup>



**11)** Reportar los resultados de las pruebas en el formato. (ANEXO II)



## SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

### METODOLOGÍA

### EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Bata</li><li>• Asa bacteriológica</li><li>• Portaobjetos</li><li>• Cubreobjetos</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li><li>• Mechero</li></ul>	-----	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agar Müeller Hinton</li></ul>

- 1) En una placa de agar Müeller Hinton inocular en todo el medio el microorganismo identificado, a partir de una colonia perfectamente aislada.

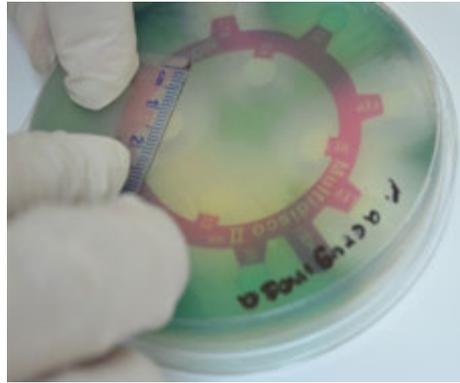
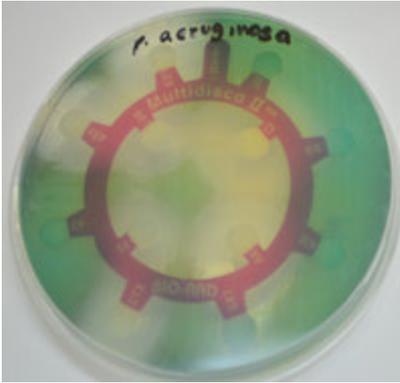


- 2) Incubar la placa a 35 °C por 24 horas.





- 3) Realizar la lectura del antibiograma, utilizando la hoja para susceptibilidad a antibióticos suministrada por el proveedor. <sup>(10)</sup> (ANEXO III)



- 4) Anotar los resultados en el formato de resultados. Se colocará el nombre del microorganismo patógeno identificado, así como la susceptibilidad a antibióticos en el formato de resultados: informe del laboratorio. (ANEXO IV)

### V.3 Fase Postanalítica

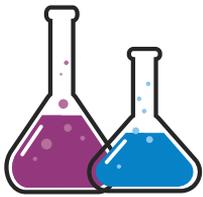
En la fase postanalítica se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica. Los resultados se deben de entregar en un informe que sea legible y fácil de comprender: informe de laboratorio. (ANEXO IV)

De igual manera se debe reportar la susceptibilidad a antibióticos del microorganismo identificado, para ello se realizará el antibiograma, siguiendo los criterios establecidos por el proveedor.



## VI. Referencias

1. Keith LM., Dalley AF., Agur AMR., Moore M. Anatomía con orientación clínica. 5a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2006.
2. Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B. Guerra H. Microbiología mecanismos de las enfermedades infecciosas. Enfoque mediante resolución de problemas. 2a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1994.
3. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop P., Schreckenberger P., Woods G. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. 6 ed. Médica Panamericana: Buenos Aires; 2008
4. Spicer W. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. Texto y atlas en color. 2a ed. Barcelona: Elsevier; 2009
5. Prats G. Microbiología Clínica. Madrid; Médica Panamericana; 2006.
6. Ingraham J., Ingraham. Introducción a la microbiología. Volúen I. Barcelona: Reverte; 1998.
7. Organización mundial de la salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3° ed. Ginebra, 2005. [223 páginas]. Disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
8. bioMérieux. Catálogo de medios de cultivo convencionales. México: bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/microbiologia-industrial/medios-de-cultivo-convencionales>
9. bioMérieux. API® 20 Staph, Sistema de identificación de estafilococos, micrococos y géneros relacionados. bioMérieux; 2009. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
10. Biorad. Discos para comprobar la susceptibilidad a los antibióticos. Biorad 2010; [7 páginas]. Disponible en: [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/Literature/inserts/66098\\_01\\_2011\\_ES.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/Literature/inserts/66098_01_2011_ES.pdf)
11. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 ([jalisco.gob.mx](http://jalisco.gob.mx))



# Unidad Aparato Genitourinario

## PRÁCTICA 7 Diagnóstico de infecciones de vías urinarias mediante el urocultivo



**Elaborado por:**  
Q.F.B. Antonio Avilés Villada  
Dr. Roberto Cruz González Meléndez



# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>271</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>273</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>273</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>275</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>275</b>
V.1 Fase Preanalítica	275
V.2. Fase Analítica	283
V.3. Fase Postanalítica	311
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>312</b>



## I. Introducción

El aparato urinario se infecta cuando las bacterias logran llegar a la vejiga, con o sin participación de ureteros y riñones; ahí comienzan a multiplicarse. Se han hecho intentos por distinguir entre infecciones que afectan a los riñones (pielonefritis) y ureteros y aquellas en las que sólo es afectada la vejiga (cistitis). Esto es importante para establecer el pronóstico a largo plazo de las infecciones recurrentes, ya que la infección repetida del riñón mismo se relaciona con la condición de daño renal permanente acompañado de cicatrización conocida como la pielonefritis crónica (un diagnóstico patológico (histológico) y no microbiológico (bacterias)); sin embargo, la diferencia entre afección de las vías urinarias no existe, y en principio es mejor considerar al aparato urinario como una sola entidad.

Estas infecciones se pueden dividir en dos tipos, primario y secundario. Las infecciones primarias ocurren en personas con aparato urinario normal y son poco comunes en varones. El factor principal que hace a la infección del aparato urinario primaria una enfermedad exclusiva de las mujeres es la anatomía de la uretra.

La infección del aparato urinario secundaria es el resultado de alguna anomalía o de instrumentación, y se presenta tanto en varones como en mujeres. El factor predisponente puede ser cualquier cosa que perturbe el funcionamiento; por ejemplo: obstrucción del flujo o incapacidad para evacuar la orina. La lista de posibilidades incluye constricción o válvulas uretrales, divertículos en la vejiga, cálculos urinarios, crecimiento de la próstata, carcinoma de la vejiga, cistitis renal, ureteros dobles, riñones en herradura, vejiga neurogénica y procedimientos terapéuticos como cateterización de la vejiga o cistoscopia.<sup>(1)</sup>

En la infección simple sin complicaciones, el 80% de las infecciones son causadas por *Escherichia coli*, entre el 7% y el 8% por *Proteus mirabilis* y una proporción similar por *Staphylococcus saprophyticus*. El restante 5% en su mayoría es por enterococos.<sup>(2)</sup>

*S. saprophyticus* es un comensal de la piel que se localiza en la superficie perineal, y menos a menudo en otras partes del cuerpo. Produce infección principalmente en mujeres jóvenes; con síntomas notables en las vías urinarias inferiores (frecuencia y disuria), hematuria y piuria intensa. En la infección secundaria muchos casos son causados por otros bacilos gramnegativos, en especial los más resistentes a antibióticos relacionados con hospitales, como *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomona aeruginosa*.<sup>(1)</sup>



Las infecciones del tracto urinario (ITU) se diagnostican habitualmente por la sintomatología, la presencia de leucocitos y bacterias en el sedimento urinario y el cultivo microbiológico de la orina. Los síntomas clínicos pueden introducirnos a sospechar la existencia de la infección, al igual que la información suministrada por el análisis microscópico del sedimento urinario, pero esta sospecha debe ser confirmada, si es posible, mediante la demostración del agente etiológico. <sup>(4)</sup>

La bacteriuria se define como «significativa» cuando una muestra de orina recogida de la porción media de la micción con técnica correcta contiene  $>10^5$  gérmenes por mililitro. La orina infectada suele contener una sola especie bacteriana. La orina contaminada tiene, en general,  $<10^4$  gérmenes por mililitro y muestra frecuentemente más de una especie bacteriana. <sup>(5)</sup>

En esta práctica se utilizará en la metodología tradicional medios de cultivo tradicionales y pruebas bioquímicas. Para la metodología moderna se utilizarán medios cromogénicos y sistema API. Ambas prácticas tendrán como control de calidad cepas puras bacterianas.

El diseño de esta práctica está encaminada a que el alumno observe de manera gráfica y sencilla los pasos para realizar una correcta toma de muestra y, a su vez, sea reproducible en cualquier laboratorio clínico. Por tal motivo y con fines de control de calidad, las prácticas se dividirán en tres etapas: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Etapas preanalítica:** se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma.

**Etapas analítica:** se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados y reactivos.

**Etapas postanalítica:** se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

Cabe señalar que al final de la práctica se realizó un cuestionario que tiene por objetivo validar



la utilidad de la misma, y con las opiniones de alumnos y profesores establecer un proceso de mejora continua de esta práctica.

## **II. Objetivos**

-  Realizar una correcta toma de muestra urinaria por chorro medio para aplicar los procedimientos para llegar al diagnóstico de infección del tracto urinario.
-  Utilizar los procedimientos de los métodos tradicional y alternativo para la identificación de microorganismos encontrados en infecciones del tracto urinario.
-  Utilizar los agares cromogénicos y sistema API como métodos alternativos de diagnóstico.
-  Utilizar las cepas puras como control de calidad para el método tradicional y alternativo.

## **III. Medidas de bioseguridad<sup>(3)</sup>**

De acuerdo a la OMS, el nivel de seguridad para un laboratorio de enseñanza básica e investigación es nivel 1, como el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la FES Zaragoza, por lo tanto, las medidas de seguridad para este nivel son:

-  Las puertas del laboratorio se mantendrán cerradas.
-  No se autorizará ni permitirá la entrada de niños en las zonas de trabajo del laboratorio.
-  Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
-  Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan implicar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados.
-  No se usará calzado abierto.



- En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
- Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.
- No se colocará ningún material en la boca ni se pasará la lengua por las etiquetas.
- Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al supervisor del laboratorio.
- Los líquidos contaminados deberán descontaminarse (por medios químicos o físicos).
- El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso y al final de cada jornada de trabajo.

### Manipulación de desechos:

- Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.<sup>27</sup>





## IV. Propósito del examen

El diseño de esta práctica va encaminado al diagnóstico microbiológico de microorganismos causantes de enfermedad en el aparato urinario, empezando desde cómo realizar una correcta toma de muestra hasta la identificación de los microorganismos patógenos en el tracto urinario utilizando el método tradicional y alternativo (medios cromogénicos y sistema API), teniendo como control de calidad las cepas puras bacterianas.

## V. Metodología

Se utilizarán dos métodos: método tradicional y el método actual de diagnóstico (sistema API 20 y medios cromogénicos). Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

### V.I. Fase Preanalítica

#### INDICACIONES Y PRECAUCIONES PARA LA TOMA DE MUESTRA.

-  Explicar al paciente en que consiste la recolección por chorro medio.
-  Obtener la primera muestra de la mañana siempre que sea posible. Permitiendo que la orina permanezca en la vejiga durante toda la noche o por lo menos 4 hrs, de esta forma se disminuirá el número de resultados falsos negativos.
-  En pacientes con sintomatología de ITU (Infección del Tracto Urinario) se puede aceptar muestra en cualquier momento del día, teniendo en cuenta que sus recuentos pueden ser menores de  $10^5$  UFC/ml.
-  No forzar la ingesta de líquidos para tratar de obtener la orina del paciente, lo cual puede diluir la orina y disminuir el recuento de colonias.
-  Es preferible que el paciente no esté tomando antibióticos al momento de la toma de muestra, ya que los cultivos pueden resultar negativos.



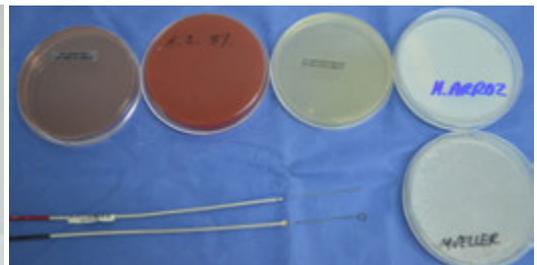
## IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Los recipientes donde se va a tomar la muestra deben estar identificados. Etiquetar la muestra con los siguientes datos:

- 🔪 Nombre completo o iniciales empezando con el apellido, número de registro, fecha y tipo de muestra de que se trata.

## EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REVELADORES PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Cubreobjetos</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Mechero</li> <li>• Frasco de muestra estéril</li> <li>• Tiras reactivas</li> <li>• Microscopio</li> <li>• Papel especial para óptica</li> <li>• Asas de siembra limpias</li> <li>• Asa de 1 µl</li> <li>• Asa de 10 µl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colorantes para tinción de Gram:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cristal violeta</li> <li>- Lugol</li> <li>- Alcohol-Cetona</li> <li>- Safranina</li> </ul> </li> <li>• Aceite de inmersión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar sangre</li> <li>• Agar chocolate</li> <li>• Agar cistina-lactosa-deficiente en electrolitos (CLED)</li> <li>• Agar McConkey</li> <li>• Agar S-110 o Agar Sal y Manitol</li> <li>• Agar Sabouraud o PDA</li> <li>• Agar Müeller Hinton</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citrato de Simmon's</li> <li>• Fenilalanina desaminasa</li> <li>• LIA</li> <li>• MIO</li> <li>• SIM</li> <li>• TSI</li> <li>• Urea de Christensen</li> <li>• Caldo nitrato</li> <li>• Caldo nitrato con campana</li> <li>• Caldo RM-VP</li> <li>• O/F Hugh Leifson con/sin sello de nujol</li> <li>• Rojo de fenol + CHO's</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloruro férrico</li> <li>• Alfa naftilamina</li> <li>• Ácido sulfanílico</li> <li>• Alfa naftol</li> <li>• KOH 30%</li> <li>• Prueba de la catalasa</li> <li>• Prueba de la coagulasa</li> <li>• Reactivo de Kovacs</li> </ul>





## PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA

Es responsabilidad del Jefe del Laboratorio de Microbiología, en la instrucción del personal de salud sobre la apropiada toma de muestra.

### TÉCNICA PARA MUJERES

- 1) La paciente debe quitarse la ropa interior.



- 2) Se lavará las manos cuidadosamente con agua y jabón, las enjuagará y las secará con una toalla limpia.

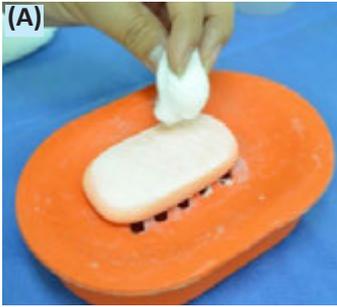


- 3) Se separarán los labios mayores y menores, y los mantendrá separados en todo momento hasta que se haya recogido la orina.





- 4) Con un algodón enjabonado (A) se lava bien la vulva pasándola de adelante hacia atrás, (B) se repetirá el proceso un total de 4 veces. \*



- 5) Luego con dos gasas adicionales y agua o solución salina estéril lavar la vulva o enjuagar cuidadosamente con agua hervida para eliminar los restos de jabón.



- 6) El frasco debe sujetarse para que no haga contacto con pierna, vulva o la ropa.

**Solo debe abrirse en el momento de la micción** y sin tocar con los dedos su interior, coloque la tapa con el lado plano hacia abajo.





- 7) Iniciar el chorro de orina, desechando los 10 primeros mililitros, retener la micción, colocar el frasco e iniciar la 2ª micción hasta la marca, retener y quitar el frasco para seguir con la micción normal.



- 8) Taparlo, lavarse las manos y marcarlo en la tapa con nombre, edad y fecha.



**NOTA:** No utilizar jabones con desinfectantes (benzalconio, hexaclorofeno u otro similar), porque una sola gota de residuo puede esterilizar la orina antes de que la muestra llegue al laboratorio.

**Comentario:** La recolección de muestras de orina de chorro medio debería ser evitada durante la menstruación.



## TÉCNICA PARA HOMBRES

- 1) El paciente debe bajarse el cierre o quitarse el pantalón y la ropa interior.



- 2) No circuncidados: Retraer completamente el prepucio y se mantendrá así en todo momento, hasta que se haya recogido la orina.

Circuncidados: no requieren mayor preparación.



- 3) Limpiar el glande con dos torundas embebidas en jabón neutro (A), prestando especial atención al meato uretral (B). \*





- 4) Luego con dos gasas adicionales eliminar los restos de jabón enjuagándolo con agua hervida o solución salina estéril.



- 5) El frasco debe sujetarse para que no haya contacto con el glande o la ropa del paciente. Solo debe abrirse en el momento de la micción y sin tocar con los dedos su interior, coloque la tapa con el lado plano hacia abajo.

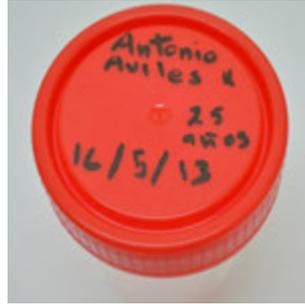


- 6) Iniciar el chorro de orina, desechando los 10 primeros mililitros, retener la micción, colocar el frasco e iniciar la 2ª micción hasta la marca, retener y quitar el frasco para seguir con la micción normal.





7) Tapanlo, lavarse las manos y marcarlo en la tapa con nombre, edad y fecha.



**NOTA:** No utilizar jabones con desinfectantes (benzalconio, hexaclorofeno u otro similar), porque una sola gota de residuo puede esterilizar la orina antes de que la muestra llegue al laboratorio.

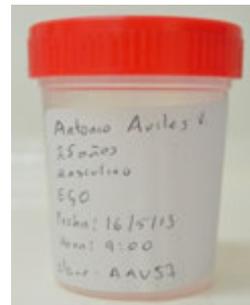
### TRANSPORTE DE LA MUESTRA

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

### ROTULACIÓN DE LA MUESTRA Y SOLICITUD ENVIADA

Rotular el frasco de orina con información del paciente y la hora de su obtención. En la solicitud del laboratorio debe indicarse los siguientes datos mínimos: edad, sexo, tipo de muestra, tratamiento previo a las 24 hrs y otros datos de acuerdo a la población en estudio.

**Comentario:** Cuando se solicita el cultivo para levaduras, inocular 10  $\mu$ l or placa y mantener los cultivos de 48 hrs para detectar levaduras con recuentos bajos.





## CRITERIOS DE RECHAZO

-  Solicite una nueva muestra de orina cuando la muestra ha sido conservada por más de 2 hrs a temperatura ambiente.
-  Toda muestra que no esté adecuadamente rotulada será rechazada.
-  Rechazar orinas de 24 hrs de recolección.
-  Rechazar muestras de orina obtenidas con el mismo método de colección dentro de las 48 hrs de recepción de la primera muestra. Llamar a esta una muestra duplicada.
-  No se recomienda el uso de bolsas colectoras de orina en pacientes pediátricos, por dificultades en su interpretación, salvo cuando los resultados son negativos.
-  Rechazar muestras que llegan en frascos abiertos y derramados.

## V.2. Fase Analítica

### UROANÁLISIS

- 1) Usar las tiras reactivas de Uroanálisis para la detección cualitativa y semicuantitativa de uno o más de analitos en orina.
  - A) Mezclar a fondo la muestra de orina. Durante el análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente. La muestra no debería reposar durante más de 2 horas antes de su análisis.

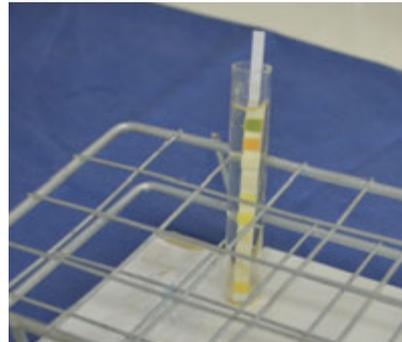




- B)** Extraer una tira reactiva y volver a cerrar el envase inmediatamente con el mismo tapón que lleva un agente secante.



- C)** Sumergir la tira brevemente (aprox. 1 segundo) en la orina, mojando todas las zonas reactivas.

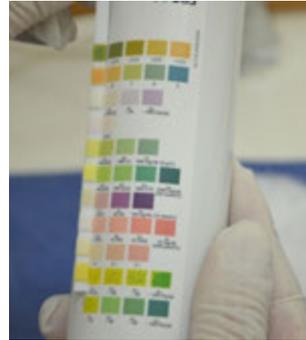


- D)** Al extraerla, rozar el canto lateral en el borde del recipiente o colocarlo en una gasa para eliminar el exceso de orina.





**E)** Al cabo de 60 segundos (para la zona de leucocitos de 60-120 segundos), comparar los colores de reacción de las zonas reactivas de la tira con la escala de colores de la etiqueta y asignar el valor del bloque cromático más parecido al color observado. Compare la novena o la décima zona reactiva (de sangre) con ambas referencias cromáticas, puesto que para los eritrocitos y hemoglobina se indican dos escalas cromáticas diferentes.



**F)** Los cambios de color que sólo aparecen en los bordes de las zonas reactivas o después de transcurridos más de 2 minutos, carecen de importancia diagnóstica.



**NOTA:** No tocar el frasco con la tira reactiva ya que está puede manchar la escala.

**2)** Examen microscópico

**a)** Examen directo

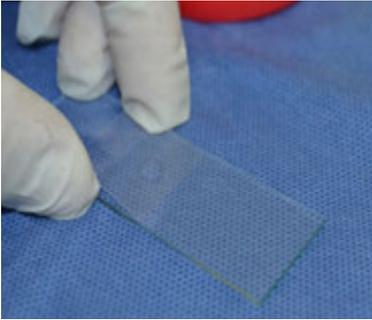
**I)** Una gota de orina fresca no centrifugada se coloca sobre un portaobjetos.

**II)** Se tapa con un cubreobjetos y se examina con luz de poca intensidad con el objetivo seco fuerte (40x) de un microscopio clínico ordinario; esto puede revelar leucocitos, células epiteliales y bacterias si se encuentran más de  $10^5$ /ml.



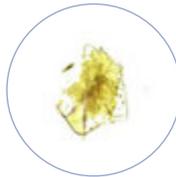
- III) El hallazgo de  $10^5$  microorganismos/ml en una muestra de orina recolectada y examinada de manera apropiada es evidencia clara de infección activa del aparato urinario (piuria).

Los bacilos gramnegativos en un frotis de orina, de mitad del chorro no centrifugada teñido con Gram diagnostican infección en el aparato urinario.



**b) Sedimento Urinario**

- I) Centrifugar 10 ml de orina a 1500 rpm x 5 min.
- II) La presencia de más de 10 leucocitos por campo es indicativo de piuria.
- III) La presencia de otros elementos formados en el sedimento (Trichomonas, leucocitos, cilindros, eritrocitos), o la presencia de proteinuria, es de poca ayuda directa en la identificación específica de infecciones activas del aparato urinario. La presencia de muchas células epiteliales escamosas, lactobacilos o flora mixta en el cultivo sugiere recolección inapropiada de la orina.



**NOTA:** Reportar los hallazgos en el **ANEXO VI**.



## INOCULACIÓN PARA EL RECUENTO DE COLONIAS

### Método de asa calibrada

- 1) Usando un asa calibrada de 1  $\mu\text{l}$  flameada y enfriada o una desechable calibrada de 1  $\mu\text{l}$ , mantener el asa verticalmente, y sumergir solamente el aro por debajo de la superficie de la muestra de orina, sin centrifugar y bien mezclada.



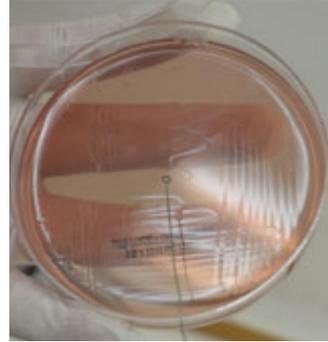
- 2) Llevar una asada de 1  $\mu\text{l}$  de la orina bien mezclada sobre la placa de agar sangre haciendo una línea recta a lo largo y por el centro del agar y estriar la orina mediante una serie de pases en ángulos de 90° a través del inóculo y después picar el agar.



- 3) Incubar a 37 °C por 18-24 hrs. Posteriormente leer.
- 4) Para el aislamiento de colonias usar Agar McConkey y sembrar por aislamiento.



- 5) Incubar a 37 °C por 24 hrs.
- 6) Cuando se utilizan 10 µl de muestra tomar una asada de orina bien mezclada para inocular y estriar en cuadrantes las placas de agar.

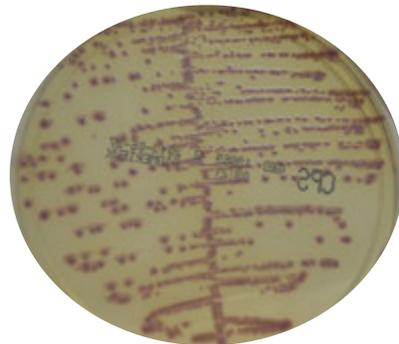


### LECTURA DE LAS PLACAS

Observar si hay crecimiento en las placas y proceder al recuento de las colonias aisladas. El número de colonias obtenido corresponde a la cifra de microorganismos presentes en 1 µl de orina al haber utilizado un asa calibrada para hacer la siembra. Si el recuento es significativo ( $> 10^5$  UFC/ml), proceder a la identificación del microorganismo.

Para los cultivos positivos, examinar los medios de cultivo para la cuantificación y tipo morfológico de los organismos presentes.

-  Con un asa de 1 µl, una colonia equivale a 1,000 UFC/ml.
-  Con un asa de 10 µl, una colonia equivale a 100 UFC / ml.





Cuando las colonias son demasiado numerosas para contar.

-  El máximo recuento usando el asa de 1  $\mu\text{l}$  es  $>10^5$  UFC/ml.
-  El máximo recuento usando el asa de 10  $\mu\text{l}$  es  $>10^4$  UFC/ml.



**UROCULTIVO**

**TABLA 1.** Descripción general del método tradicional y alternativo.

Método tradicional		Método alternativo de diagnóstico	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
<p>La inoculación de orina se realizará por aislamiento en los medios de cultivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Agar sangre</li> <li>* Agar cistina-lactosa-deficiente en electrólitos (CLED)</li> <li>* Agar McConkey</li> <li>* Agar S-110 o Agar Sal y Manitol</li> <li>* Agar Sabouraud o PDA</li> </ul> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Se incuban de 35-37 °C durante 18 a 24 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Después de la incubación observar la morfología colonial para cada medio de cultivo sembrado.</p>		<p style="text-align: center;"><b>Medios Cromogénicos</b></p> <p>La inoculación de orina se realizará por aislamiento en los medios cromogénicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* CPS ID 3</li> <li>* Candida ID</li> </ul> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar de 35 a 37 °C de 24 a 48 hrs.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Observar las colonias aisladas, comparar con la literatura y reportar.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Realizar el llenado de las galerías de API 20 con una cepa problema en:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* API 20 E</li> <li>* API 20 C AUX</li> </ul>	



Método tradicional		Método alternativo de diagnóstico	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Realizar las siguientes actividades:			
<p style="text-align: center;">↓</p> <p>En las colonias de agar sangre observar el tipo de hemólisis y realizar las pruebas de catalasa y coagulasa.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Realizar la tinción de Gram.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Realizar las siguientes pruebas bioquímicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* SIM</li> <li>* MIO</li> <li>* TSI</li> <li>* LIA</li> <li>* Urea</li> <li>* Citrato de Simmons</li> <li>* Medio Manitol Hugh-Leifson con sello</li> <li>* Medio Manitol Hugh-Leifson sin sello</li> <li>* Caldo nitrato</li> <li>* RM-VP</li> </ul> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar a 37 °C por 18-24 hrs. Posteriormente leer.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>En las colonias formadas en agar papa dextrosa realizar la prueba de tubo germinal.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Efectuar Antibiograma de bacterias patógenas encontradas y reportar.</p>			



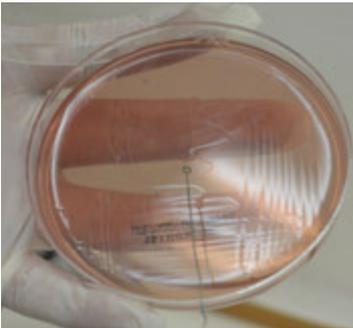
## A) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO TRADICIONAL

1) Con un asa bacteriológica esterilizada, tomar una asada directamente del frasco de orina y sembrar por aislamiento en 3 o 4 cuadrantes en los siguientes medios:

 Agar cistina-lactosa-deficiente en electrolitos (CLED)

 Agar S-110 o Agar Sal y Manitol

 Agar Sabouraud o PDA



Agar McConkey

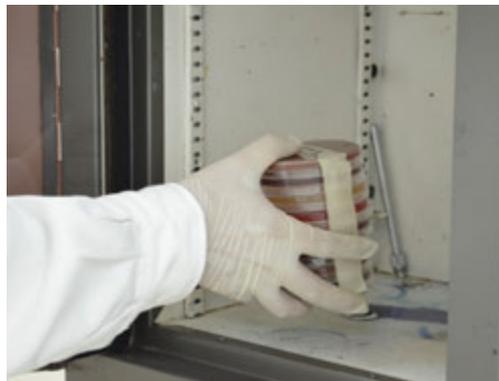


Agar Sal y Manitol



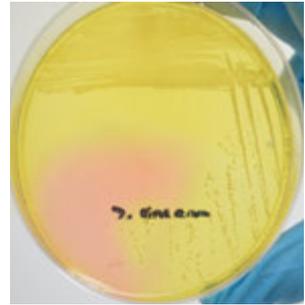
Agar Sabouraud

2) Incubar de 35-37 °C durante 18 a 24 horas.

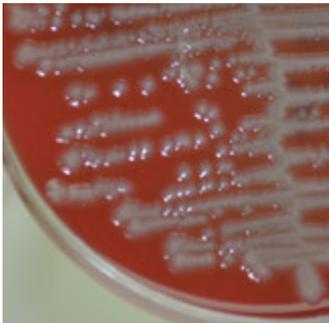




- 3) Observar la morfología en cada uno de los medios inoculados y seleccionar el crecimiento del posible patógeno.



- 4) De acuerdo al punto 3 de Urianálisis, observar en la placa de agar sangre si hubo hemólisis y realizar la prueba de catalasa y coagulasa de una colonia aislada.

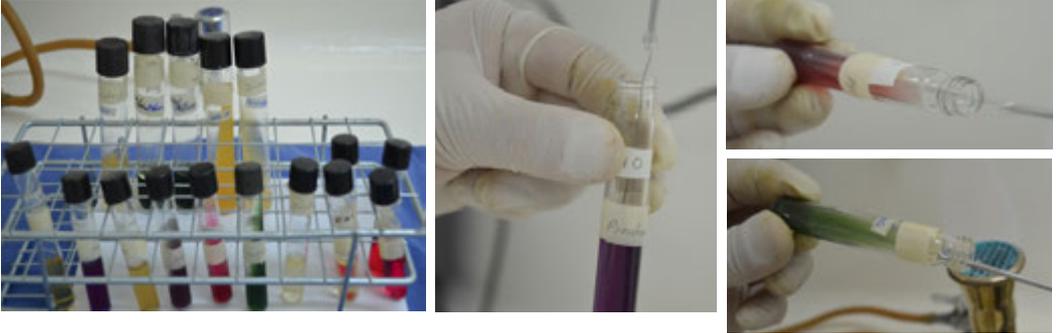


- 5) Realizar la tinción de Gram de una cepa aislada de los medios inoculados. Observar la preparación teñida en el microscopio, utilizando objetivos: seco fuerte (40X) e inmersión (100X).

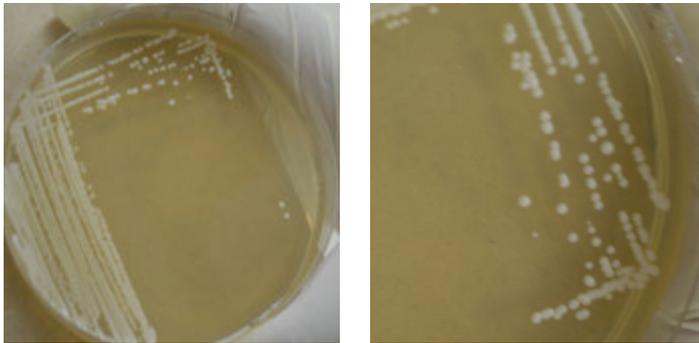




- 6) Realizar la inoculación en las pruebas bioquímicas, a partir de colonias bien aisladas de los medios de cultivo utilizados.



- 7) Incubar a 37 °C por 18-24 hrs. Posteriormente leer las pruebas bioquímicas.
- 8) En las colonias formadas en agar Sabouraud realizar la prueba de tubo germinal. (ANEXO VII)



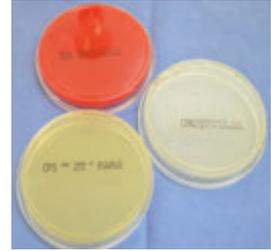
- 9) Reportar todos los resultados en los formatos para el método tradicional. (ANEXO I)



## B) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO

### MEDIOS CROMOGENICOS

MATERIAL	MEDIOS DE CULTIVO: AGAR CROMOGENICO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Asa bacteriológica</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li><li>• Mechero bunsen</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Crom Candida ID</li><li>• Crom CPS ID</li><li>• Crom COS ID</li></ul>



1) Tomar una asada directamente del frasco con orina y sembrar por aislamiento en tres o cuatro cuadrantes en los medios cromogénicos:

-  COS ID
-  CPS ID
-  Candida ID





2) Incubar las placas en atmósfera aerobia de 35 a 37 °C de 24 a 48 hrs.



3) Efectuar la lectura de las placas y anotar el resultado correspondiente en la tabla de resultados para medios cromogénicos. (ANEXO II)



Crom CPS / *Proteus mirabilis*



Crom Columbia / *E. coli*



Crom Candida / *Candida albicans*



## API 20E

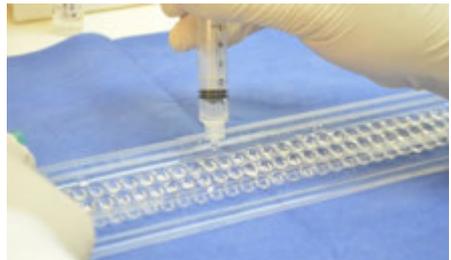
MATERIAL	REACTIVOS PARA REVELADO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Kit API 20 E</li><li>• Jeringa de 1ml o pipeta Pasteur</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <math>\text{FeCl}_3</math> 10% (TDA)</li><li>• KOH al 40% (VP1)</li><li>• Naftol (VP2)</li><li>• Kovacs o dimetilamino-cinamaldehído o reactivo de James.</li><li>• Tetrafenilendiamina</li><li>• NIT 1 y NIT 2</li><li>• Zn</li></ul>



## METODOLOGÍA

### Preparación de la tira

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.





- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).



- 3) Sacar una galería API 20 E de su envase individual.



- 4) Colocar la galería en la cámara de incubación.

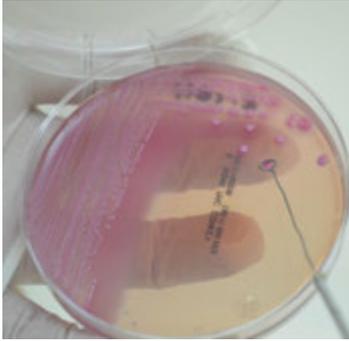
### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 5) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Médium (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Médium (5 ml) o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.





- 6) A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, hacer una suspensión en 5 ml de solución salina (0.85% de NaCl) o 5 ml de agua estéril. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).



- 7) Con la ayuda de la jeringa o pipeta Pasteur, introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos, colocar la punta de la jeringa o pipeta Pasteur sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia delante.





- 8) Llenar el tubo y la cúpula de los pocillos CIT\*, VP\*, GEL\* con la suspensión de bacterias evitando la formación de burbujas y apoyando la punta de la jeringa sobre el borde de la cúpula. Cada cúpula se llena hasta obtener un nivel horizontal o ligeramente convexo, nunca cóncavo para generar resultados correctos.



\*CIT= utilización del citrato

\*VP= producción de acetoina (Voges Proskauer)

\*GEL= gelatinasa (gelatina)

- 9) Para las otras pruebas, llenar únicamente los tubos (no las cúpulas).





- 10)** Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos de ADH\*, LDC\*, ODC\*, URE\*, H2S\* para obtener anaerobiosis.



ADH= Arginina-dihidrolasa

URE= Ureasa

LDC =Lisina Decarboxilasa

H2S= Producción de H<sub>2</sub>S

ODC=Ornitina Decarboxilasa

- 11)** Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación y cerrar las cámaras de incubación.



- 12)** Incubar a 37 °C durante 18-24 as.





## LECTURA E INTERPRETACIÓN

**13)** Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO II)



**14)** Determinadas pruebas requieren ser reveladas, para el revelado se tienen que tener en cuenta dos criterios:

- 🧪 Si la glucosa da negativo y los test positivos son dos o menos de dos, no hay que añadir reactivos.
- 🧪 Si la glucosa es positiva y/o tres o más test son positivos se revelan los test que requieren reactivos:

**TDA:** añadir una gota de  $\text{FeCl}_3$  10% (una gota del reactivo TDA).

Positivo= color marrón oscuro





**VP:** añadir una gota del reactivo VP1 y una gota del reactivo VP2.

Positivo= color rosa fuerte o rojo en 5-10 minutos.

Negativo= color rosa débil después de los 10 minutos.



**IND:** añadir una gota de reactivo de Kovacs<sup>1</sup> o dimetilamino-cinamaldehído<sup>2</sup>. O reactivo de James<sup>3</sup> dependiendo del reactivo utilizado pueden darse las posibilidades siguientes:

<sup>1</sup>Positivo= aparece un anillo rosa-rojo.

<sup>2</sup>Positivo= color de rosa a morado en todo el pocillo.

<sup>3</sup>Positivo= rosa



**Oxidasa:** es la prueba número 21 y se realiza de forma independiente a la tira. Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

Positivo= color azul que aparece inmediatamente.



Reducción de los nitratos en nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y en nitrógeno ( $\text{N}_2$ ): añadir una gota de los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos.

Positivo ( $\text{NO}_2$ )= coloración roja



Negativo= coloración amarilla, puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de micro-burbujas): agregar de 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula GLU. Después de 5 minutos, si el color sigue siendo **amarillo**, indica una reacción **positiva** ( $\text{N}_2$ )

Negativo= coloración naranja-rojizo de la cúpula, ya que los nitratos aún presentes en el tubo han sido reducidos a nitritos por el Zinc.



**15)** Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa).

Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 o 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

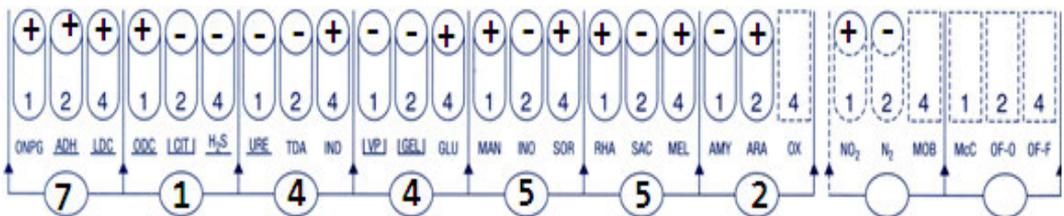
-  Si la reacción es negativa en un pocillo se pone 0.
-  Si la reacción es positiva en el primer pocillo se escribe 1, si es positiva en el segundo pocillo se escribe 2 y si es positivo en el tercero se escribe 4 obteniendo un triplete.
-  Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata. <sup>(9,10,11)</sup>





16) Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato para API 20 E. (ANEXO II)

 <p>ONPG ADH LDC</p>	 <p>ODC CIT H2S</p>	 <p>URE TDA IND</p>
 <p>VP GEL GLU</p>	 <p>MAN INO SOR</p>	 <p>RHA SAC MEL</p>
 <p>AMY ARA OX NO2 N2</p>	<p>PERFIL NUMÉRICO DE 7 CIFRAS: 7144552</p> <p>IDENTIFICACIÓN:</p>	





## API 20C AUX

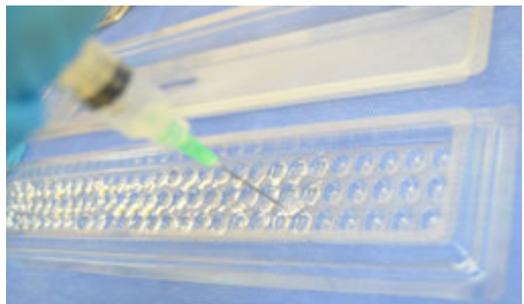
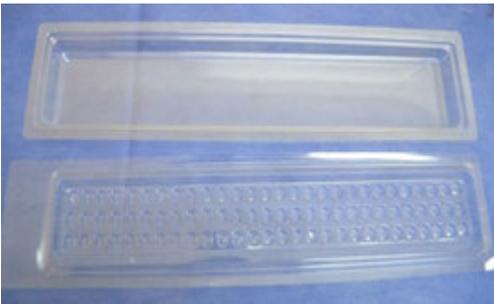
### METODOLOGÍA

MATERIAL	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Kit API 20C AUX</li><li>• Micropipeta de 100µl</li><li>• Solución fisiológica de NaCl al 0.85%</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Patrón 2 de MacFarland</li><li>• Ampolla API C Médium</li></ul>



### PREPARACIÓN DE LA GALERÍA

- 1) Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada [o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles de liberar gases (Ej.: Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.)] en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.





- 2) Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar desplazada durante la manipulación).



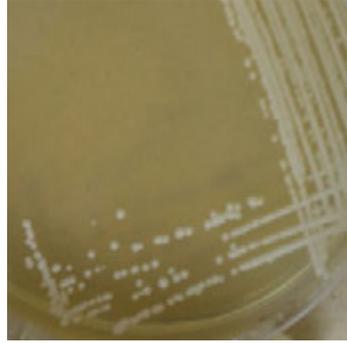
- 3) Retirar la galería de su envase individual y depositarla en la cámara de incubación.

#### **PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

- 4) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Médium o una solución estéril que contenga la misma solución sin aditivos.

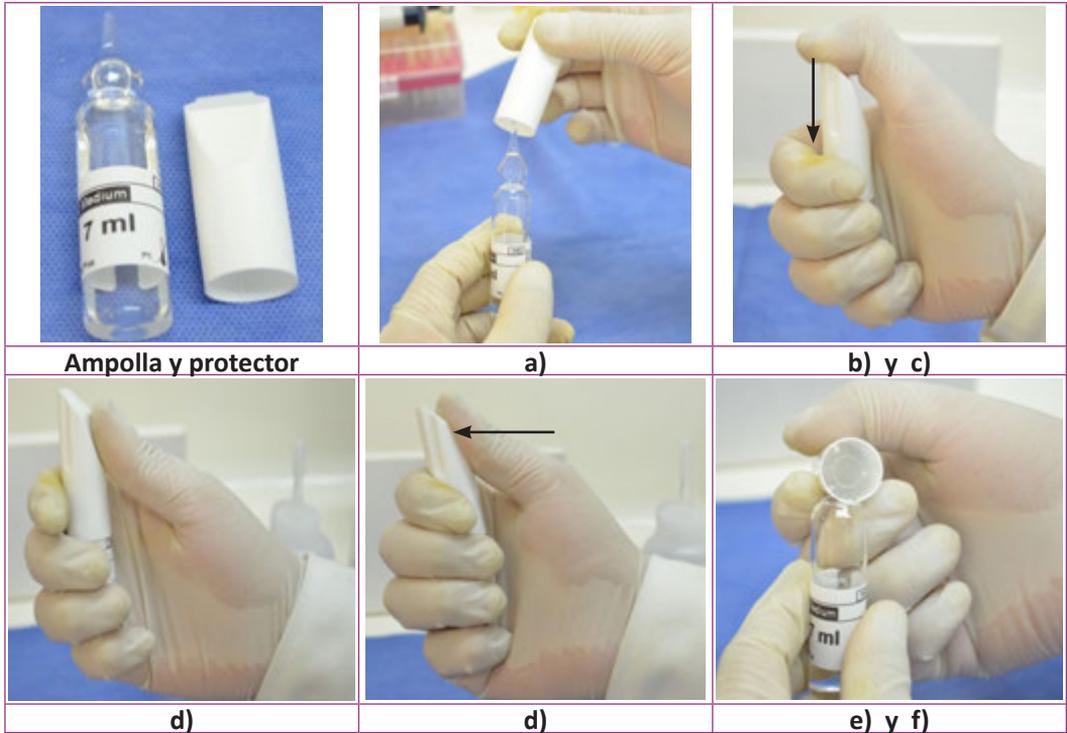


- 5) A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión de levaduras de turbidez igual a la del patrón 2 de McFarland. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.



**6)** Abrir una ampolla de API C Médium:

- a)** Introducir la ampolla en el protector de ampolla.
- b)** Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
- c)** Presionar a fondo el tapón blanco.
- d)** Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
- e)** Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
- f)** Retirar delicadamente el tapón.



- 7) Con la ayuda de la micropipeta, transferir 100 microlitros de la suspensión de levaduras a una ampolla de C Médiu y homogeneizar con la micropipeta evitando la formación de burbujas.



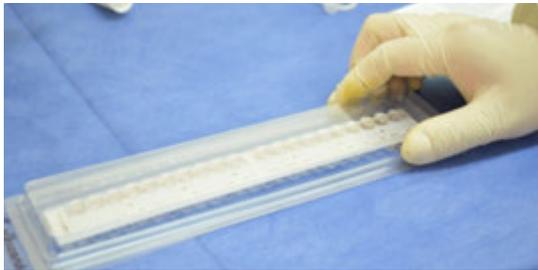


## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 8) Llenar las cúpulas con la suspensión obtenida en el API C Médium. Evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula. Cuidar que se cree un nivel horizontal o ligeramente convexo pero jamás cóncavo. Las cúpulas parcial o excesivamente llenas son causa de resultados incorrectos.



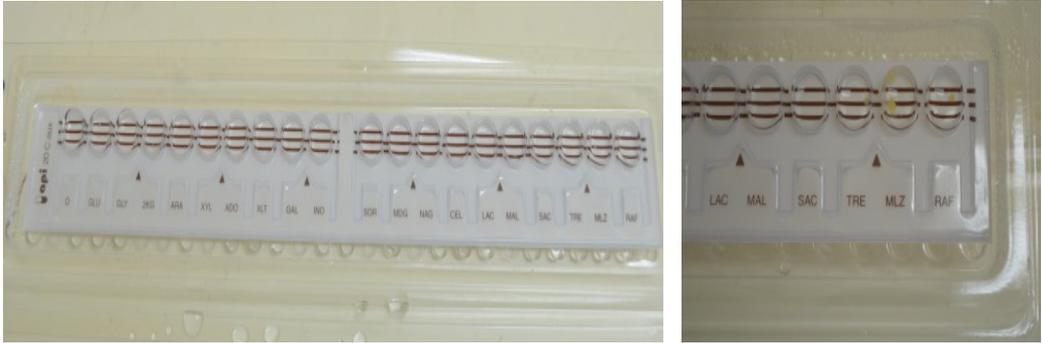
- 8) Volver a cerrar la cámara de incubación e incubar 48-72 horas ( $\pm 6$  horas) a  $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



## LECTURA DE LA GALERÍA

Después de 48 horas de incubación, o de 72 horas (si los ensayos, no resultan muy claros después de 48 horas), observar el crecimiento de las levaduras comparativamente con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula **con mayor turbidez** que la de control nos indica una reacción **positiva** que ha de ser anotada en la hoja de resultados.

Con el fin de evitar toda contaminación durante una reincubación, levantar la tapa exclusivamente durante el período de lectura.



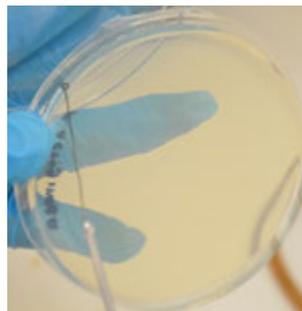
## SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

### EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Bata</li><li>• Asa bacteriológica</li><li>• Multidiscos Gram positivos y Gram negativos</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li><li>• Mechero</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agar Müeller Hinton</li></ul>

### PROCEDIMIENTO

- 1) En una placa de Müeller Hinton inocular en todo el medio el microorganismo identificado, a partir de una colonia perfectamente aislada.





- 2) Colocar los multidiscos sobre el agar inoculado e incubar la placa a 35 °C por 24 horas.



- 3) Realizar la lectura del antibiograma, utilizando la hoja para susceptibilidad a antibióticos suministrada por el proveedor. (9) (ANEXO III)



- 4) Anotar los resultados y en el formato de “Informe de Laboratorio”. Se colocará el nombre del microorganismo patógeno identificado, así como la susceptibilidad a antibióticos en dicho formato. (ANEXO IV)

## **V.I Fase Postanalítica**

Los resultados e interpretación se anotarán en el formato de Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas (ANEXO IV). Se colocará el nombre del microorganismo(s) patógeno(s) identificado(s), así como la susceptibilidad a antibióticos en dicho formato.



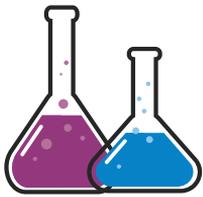
## VI. Referencias

1. Duerden, B.I. Microbiología de Enfermedades Infecciosas. México. Limusa SA de CV; 1993.
2. Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. 12º Edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009.
3. Organización mundial de la salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3º ed. Ginebra, 2005. [223 páginas]. Disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
4. Paredes F., Teresa M., García P. Microbiología Clínica Aplicada. 3º Edición. España: Ed. Díaz de Santos: 1997.
5. Mims CA, Playfair J, Raitt IM, Wakelin D, Williams R, Anderson RM. Microbiología médica. Madrid: Mosby; 1995.
6. Soto J. Guillén A. Rojas R. Manual de procedimientos para el Cultivo de orina (urocultivo). Sociedad Científica Peruana de Microbiología. 2012
7. García A., Zamudio M. Manual de Microbiología Médica. Aparato Genitourinario. 2 ed. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 2010.
8. Biomeriux. Medios cromogénicos chromID. 2012. Disponible en: [http://www.biomerieux.com.mx/servlet/srt/bio/mexico/dynPage?doc=MEX\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_35](http://www.biomerieux.com.mx/servlet/srt/bio/mexico/dynPage?doc=MEX_CLN_PRD_G_PRD_CLN_35). Acceso 26 enero de 2021.
9. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop P., Schreckenberger P., Woods G. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. 6 ed. Médica Panamericana: Buenos Aires; 2008.
10. API20 E. Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes. 2009; [56 páginas]. Disponible en: <http://lycee-valin.fr/bgb/ftapi/4.pdf>
11. Prats G. Microbiología Clínica. Madrid; Médica Panamericana; 2006.
12. bioMérieux. API® 20 Staph, Sistema de identificación de estafilococos, micrococos y géneros relacionados. bioMérieux; 2009. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
13. Biorad. Discos para comprobar la susceptibilidad a los antibióticos. Biorad 2010; [7 páginas]. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/>



14. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 (jalisco.gob.mx)





# Unidad Aparato Genitourinario

## PRÁCTICA 8 Diagnóstico de infecciones del tracto genital femenino mediante el exudado vaginal



**Elaborado por:**

Q.F.B. Antonio Avilés Villada

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz



# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>317</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>319</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>319</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>320</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>321</b>
V.1 Fase Preanalítica	321
V.2. Fase Analítica	333
V.3. Fase Postanalítica	354
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>355</b>



## I. Introducción

La muestra de exudado vaginal es obtenida para diagnosticar el síndrome de vulvovaginitis (inflamación de la vagina) y vaginosis bacteriana (alteración del equilibrio de la flora vaginal sin inflamación).

La inflamación de la mucosa vaginal, denominada vaginitis, es un síndrome clínico común que determina alrededor de 10 millones de consultas médicas por año. Las mujeres que presentan síntomas vaginales a menudo manifiestan flujo anormal y tal vez otros síntomas, como olor desagradable o prurito. <sup>(4)</sup>

Hay cuatro causas infecciosas comunes: candidiasis, tricomoniasis, vaginosis bacteriana y herpes genital. <sup>(2)</sup>

La candidiasis se caracteriza por prurito y por una secreción espesa, blanquecina, y que tiene aspecto cuajado. Puede presentarse dispareunia (dolor durante el coito) y disuria. El examen microscópico muestra hongos y pseudohifas con una laminilla húmeda en KOH al 10%. <sup>(2)</sup>

La tricomoniasis es causada por el protozoo flagelado *Trichomonas vaginalis*. La infección se adquiere por contacto sexual. La tricomoniasis puede ser asintomática, pero a menudo produce prurito intenso con una secreción abundante, purulenta, espumosa y fétida. La pared vaginal eritematosa está enrojecida, pero es raro el “cuello uterino en fresa” distintivo, friable y con hemorragias punteadas. Se examina la secreción vaginal reciente en una laminilla húmeda con solución salina para demostrar tricomonas móviles. <sup>(2)</sup>

La vaginosis bacteriana parece asociarse con una reducción de los lactobacilos y la producción de peróxido de hidrógeno, una elevación del pH vaginal y el sobrecrecimiento de los microorganismos asociados con la vaginosis bacteriana. La actividad sinérgica de varios microorganismos anaerobios, entre ellos especies de *Prevotella*, especies de *Porphyromonas*, peptoestreptococos, especies de *Mobiluncus* y micoplasmas, así como *Gardnerella vaginalis*, parece contribuir a producir la infección. La vaginosis bacteriana se caracteriza por una irritación perivaginal bastante más leve que la de la tricomoniasis o la candidiasis y por lo general se asocia con un flujo maloliente que con frecuencia se describe como con “olor a pescado”, también puede sentir dolor al orinar o picazón en la parte exterior de la vagina o ambas cosas. Algunas manifiestan no tener signos ni síntomas. <sup>(2)</sup>



La vaginosis bacteriana es la causa más frecuente consultada de la mujer por síntomas vaginales (40-50%) seguida por candidiasis (20-25%) y tricomoniasis (15-20%).

Esta práctica tiene como apoyo el simulador ginecológico femenino el cual ayudará a realizar una correcta toma de muestra, para posteriormente, aplicar la metodología tradicional y moderna de diagnóstico clínico tomando en cuenta las medidas de bioseguridad del laboratorio para poder obtener un resultado confiable.

Para la metodología tradicional se utilizarán medios de cultivo tradicionales y pruebas bioquímicas. Para la metodología alternativa se utilizarán medios cromogénicos y sistema API. Ambas prácticas tendrán como control de calidad cepas puras.

El diseño de esta práctica está encaminada a que el alumno observe de manera gráfica y sencilla los pasos para realizar una correcta toma de muestra y, a su vez, sea reproducible en cualquier laboratorio clínico. Por tal motivo y con fines de control de calidad, las prácticas se dividirán en tres etapas: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Etapas preanalítica:** se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma.

**Etapas analítica:** se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados y reactivos.

**Etapas postanalítica:** se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

Cabe señalar que al final de la práctica se realizó un cuestionario que tiene por objetivo validar la utilidad de la misma, y con las opiniones de alumnos y profesores establecer un proceso de mejora continua de esta práctica.



## II. Objetivos

-  Realizar la correcta toma de muestra de un exudado vaginal utilizando el modelo anatómico femenino.
-  Aplicar los métodos tradicional y alternativo para la identificación de microorganismos encontrados en infecciones vaginales.
-  Utilizar los agares cromogénicos y sistema API como métodos alternativos de diagnóstico.
-  Utilizar cepas puras como control de calidad para el método tradicional y alternativo.

## III. Medidas de bioseguridad<sup>(3)</sup>

De acuerdo a la OMS, el nivel de seguridad para un laboratorio de enseñanza básica e investigación es nivel 1, como el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la FES Zaragoza, por lo tanto, las medidas de seguridad para este nivel son:

-  Las puertas del laboratorio se mantendrán cerradas.
-  No se autorizará ni permitirá la entrada de niños en las zonas de trabajo del laboratorio.
-  Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
-  Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan implicar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados.
-  No se usará calzado abierto.
-  En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
-  Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.



- 🧪 No se colocará ningún material en la boca ni se pasará la lengua por las etiquetas.
- 🧪 Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al profesor del laboratorio.
- 🧪 Los líquidos contaminados deberán descontaminarse (por medios químicos o físicos).
- 🧪 El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- 🧪 Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso y al final de cada jornada de trabajo.

### Manipulación de desechos:

- 🧪 Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. <sup>27</sup>



## IV. Propósito del examen

Se basa en efectuar una toma de muestra apropiada para realizar el diagnóstico microbiológico de patógenos que producen la infección en el tracto genital femenino utilizando dos métodos: tradicional y alternativo, empleando cepas puras como control de calidad.



## V. Metodología

Se utilizarán dos métodos: método tradicional y el método alternativo de diagnóstico (sistema API 20 y medios cromogénicos). Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

### V.I. Fase Preanalítica

#### PREPARACIÓN DEL PACIENTE

En las 48 horas previas a la realización del examen la paciente NO DEBERÁ mantener relaciones sexuales, ni realizarse irrigaciones o colocarse óvulos, cremas o cualquier otro tipo de medicación vaginal.

Informar a la paciente que no se aplique pomadas o espermaticidas por vía vaginal por lo menos la noche previa a la toma de muestra y que no esté menstruando.

Es preferible que la paciente haya orinado una hora o media hora antes de la toma de muestra para que le cérvix pueda verse completo y evitar molestias a la paciente.

#### CRITERIOS DE RECHAZO DE LA PACIENTE

-  En caso de que la identificación del paciente no sea la correcta.
-  Que se haya aplicado duchas, pomadas, óvulos o espermicidas una noche antes de la muestra.
-  Pacientes en período menstrual.
-  Si la paciente tomó antibióticos.
-  Si ha mantenido relaciones sexuales 48 hrs antes de la toma de muestra.



## IDENTIFICACIÓN

Los recipientes donde se va a tomar la muestra deben estar identificados. Etiquetar la muestra con los siguientes datos:

-  Nombre completo o iniciales empezando con el apellido, número de registro, tipo de muestra, sexo, edad, fecha y hora de toma de muestra.

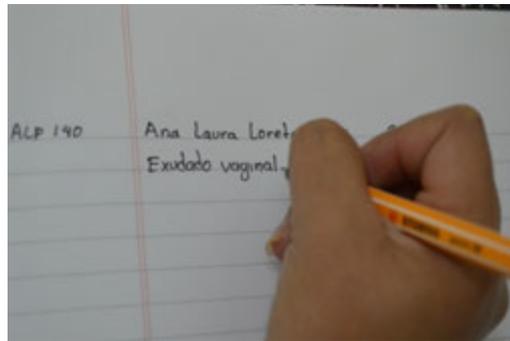
## EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REVELADORES PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata para el paciente</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Guantes desechables</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Cubreobjetos</li> <li>• Cepillo cervical estéril</li> <li>• Hisopo de algodón</li> <li>• Espejo vaginal metálico o desechable</li> <li>• Gradilla</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Mechero</li> <li>• Mesa de exploración ginecológica</li> <li>• Mesa de Mayo</li> <li>• Lámpara de chicote</li> <li>• Microscopio</li> <li>• Estufa de incubación</li> <li>• Papel indicador pH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colorantes para tinción de Gram:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cristal violeta</li> <li>- Lugol</li> <li>- Alcohol-Cetona</li> <li>- Safranina</li> </ul> </li> <li>• Aceite de inmersión</li> <li>• Fijador</li> <li>• Medio de transporte Stuart</li> <li>• Solución salina isotónica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Sabouraud o PDA</li> <li>• Agar Harina de maíz</li> <li>• Agar McConkey</li> <li>• Agar Chocolate</li> <li>• Agar Müeller Hinton</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citrato de Simmon's</li> <li>• Fenilalanina desaminasa</li> <li>• LIA</li> <li>• MIO</li> <li>• SIM</li> <li>• TSI</li> <li>• Urea de Christensen</li> <li>• Caldo nitrato</li> <li>• Caldo nitrato con campana</li> <li>• Caldo RM-VP</li> <li>• O/F Hugh Leifson con/sin sello de nujol</li> <li>• Rojo de fenol + CHO's</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloruro férrico</li> <li>• Alfa naftilamina</li> <li>• Ácido sulfanílico</li> <li>• Alfa naftol</li> <li>• KOH 30%</li> <li>• Prueba de la catalasa</li> <li>• Prueba de la coagulasa</li> <li>• Reactivo de Kovacs</li> </ul>

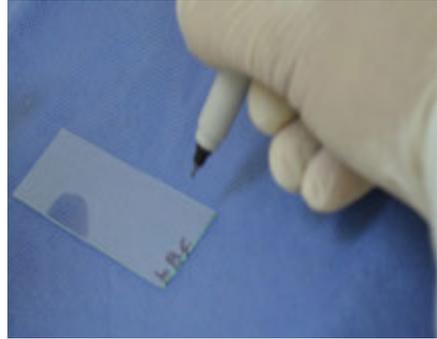


**PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA**

- 1) Realizar la identificación del paciente en la libreta especial.



- 2) Rotular el medio de transporte y los medios con los datos del paciente.



- 3) Pasar a la paciente al consultorio y si lo desea a su acompañante.



- 4) Explicar a la paciente en forma verbal en que consiste la toma de muestra.





- 5) Se le pide que se quite la ropa de la cintura para abajo, se ponga la bata quirúrgica con la abertura hacia atrás y suba a la mesa de exploración en posición ginecológica.



- 6) Se prepara el material estéril a utilizar: espejo vaginal, hisopos de algodón, cepillo cervical, gasas, portaobjetos, medios de cultivo, fijador, KOH y medios de transporte.



- 7) La persona que va a tomar la muestra se lava las manos antes de iniciar el procedimiento.



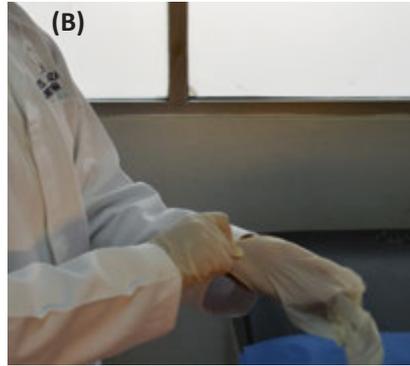


- 8)** Se coloca primero el cubrebocas (A) y después los guantes desechables (B).

(A)



(B)



- 9)** Iluminar con la lámpara y localizar la vagina.



- 10)** Se aplica una presión hacia abajo en la abertura vaginal con dos dedos.

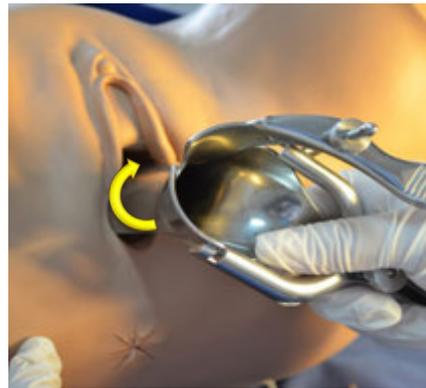




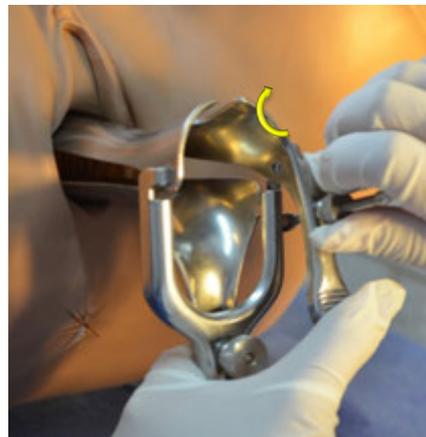
**11)** Con los dedos todavía en esa posición, introduzca el espéculo cerrado de forma vertical lentamente. (Se puede auxiliar de un abatelenguas para introducir el espejo vaginal).



**12)** Retire sus dedos y gire el espéculo hacia la horizontal, introduciéndolo a lo largo del canal vaginal. Se dirige el espéculo hacia abajo, con un ángulo de 45°.



**13)** Proceda a abrir el espéculo y atórelo con el tornillo para que no se cierre.

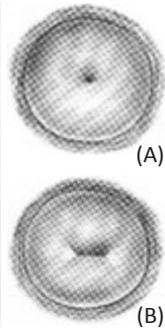




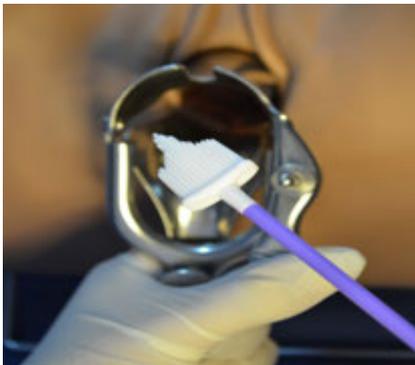
- 14)** Gire el espéculo ligeramente, hasta que vea el cuello. El espéculo en posición, bloqueado y estable, obsérvese la completa visión del cérvix.



- 15)** El orificio de la mujer nulípara es pequeño (A), redondeado u oval. El de la multípara suele ser una hendidura horizontal o puede ser irregular y estrellado (B).



- 16)** Introducir el cepillo cervical colocando la punta dentro del endocérnix y rotar el cepillo 360° dos veces.

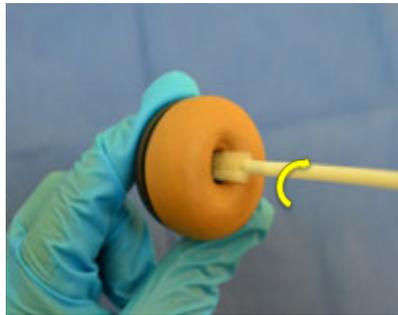




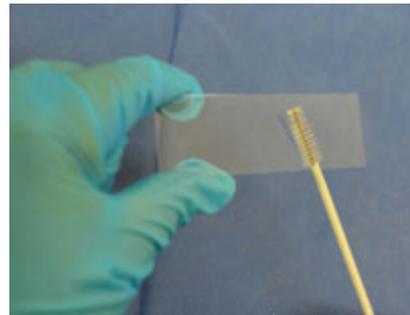
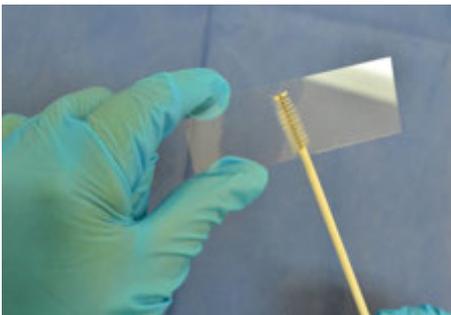
- 17)** Sacar el cepillo, sin tocar las paredes, y en un portaobjetos realizar un suave extendido. Después aplicarle fijador.



- 18)** Comprimir el cérvix e introducir el hisopo de alginato, en el canal endocervical con suaves movimientos rotatorios de 10 a 30 segundos.

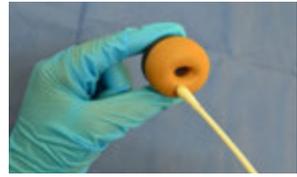


- 19)** Realizar un barrido suave con el hisopo de alginato de un extremo hacia otro de manera como si lo desenrollara para no dañar las células. Después aplicar el fijador.

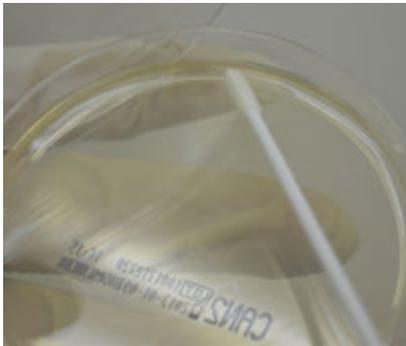




- 20) Con un hisopo de algodón, raspar la zona del saco vaginal (exocérvix), rotar suavemente dando dos vueltas contra las paredes vaginales.



- 21) Sacar el hisopo y sembrar sobre los medios de agar, depositando la muestra suavemente sobre un extremo (A). Ya sea en solución isotónica previamente calentada a 37 °C o en medio de transporte específico, se corta el mando con la finalidad de cerrar el vial dejando el hisopo dentro (B). ( Se puede tomar un tubo con solución salina para búsqueda de *Trichomona vaginalis*).



(A)



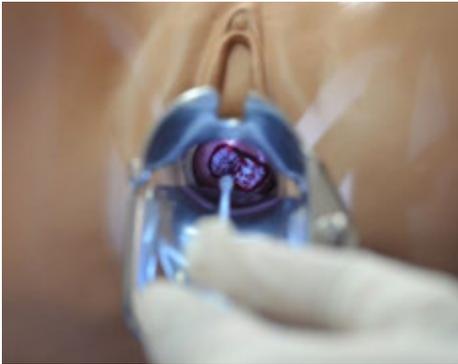
(B)





**22)** Con un segundo hisopo volver a rotar suavemente dos vueltas contra las paredes vaginales (A) y se realizan dos extensiones sobre dos portaobjetos\* (B).

(A)

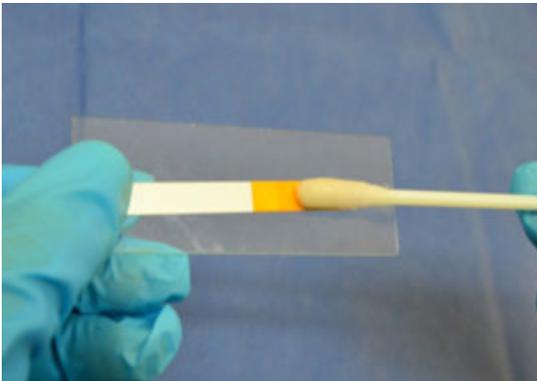


(B)



\*Una extensión en portaobjetos es para tinción de Gram y Giemsa.  
La otra extensión para prueba de aminas con KOH 10%.

**24)** Con el mismo hisopo tomar el pH con un papel indicador sobre otro portaobjetos para después compararlo con la escala de pH.





**24)** Para estudios de infección gonocócica y pruebas para detección de Clamydia, se introduce un hisopo especial evitando el contacto con la mucosa vaginal, dentro del endocérnix, sin rotar, se mantiene ahí por 30 segundos.



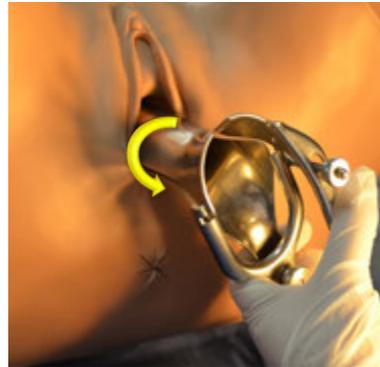
**25)** Este hisopo se introduce en el medio de transporte específico, y se cierra el vial dejando el hisopo dentro. Rotularlo con los datos de la paciente.



**26)** Desbloquee el tronillo del espéculo (A) y retírelo suavemente, rotándolo mientras lo retira, lo que permitirá inspeccionar las paredes vaginales (B).



**(A)**



**(B)**

**27)** Terminado el procedimiento se le pide al paciente que se vista.

**28)** La muestra se coloca en la charola de muestra microbiológica y se transporta a la recepción del laboratorio de microbiología clínica.



**TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN**

El envío de la muestra debe ser inmediato siempre que sea posible. Cuando la muestra no pueda procesarse antes de 15 minutos deberán emplearse hisopos con medio de transporte tipo Stuart-Amies, que se mantendrán a temperatura ambiente, o preferentemente, en estufa 35-37 °C hasta su procesamiento, que deberá ser antes de 3-6 horas. El examen en fresco deberá observarse inmediatamente o de lo contrario mantener en estufa a 37 °C por no más de 1 hora.

**V.2. Fase Analítica**

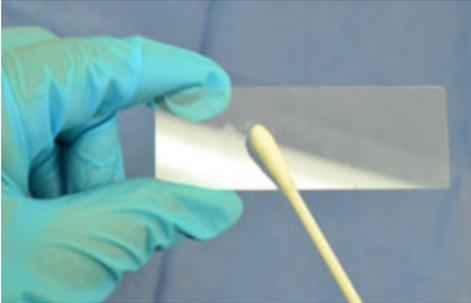
**TABLA 1.** Procedimiento de los métodos tradicional y alternativo.

Método tradicional		Método alternativo de diagnóstico	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
Sembrar por aislamiento en los medios inoculados: * Agar McConkey o EMB * Agar Sabouraud o PDA ↓ Se incuban a 37 °C durante 24 horas. ↓ Después de la incubación describir la morfología colonial para cada medio de cultivo sembrado. ↓ Realizar la tinción de Gram. ↓ Para las colonias en McConkey realizar las pruebas bioquímicas. ↓ Incubar a 37 °C por 18-24 hrs. Posteriormente leer. ↓ En las colonias formadas en agar papa dextrosa realizar la prueba de tubo germinal. ↓ Efectuar Antibiograma de bacterias patógenas encontradas y reportar.		<b>Medios cromogénicos</b> Extender la muestra para aislamiento en los siguientes medios cromogénicos: * Crom CPS ID * Crom Candida ID ↓ Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 24 hrs. ↓ Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella. ↓ Observar las colonias aisladas, comparar con la literatura y reportar. ↓ Realizar el llenado de las galerías de API 20 con una cepa problema en: * API 20 E * API 20 C AUX	

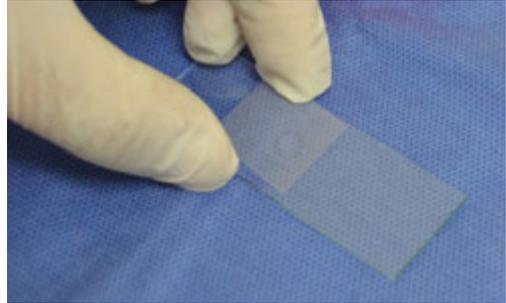


## A) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO TRADICIONAL

- 1) Con el hisopo en solución salina al 0.85% se coloca una gota en un portaobjetos para realizar una observación en fresco al microscopio (objetivo 40X) (A). Con el medio Stuart se realiza un extendido, se coloca una gota de solución salina estéril, se cubre con un cubreobjetos y se observa a seco fuerte (B).

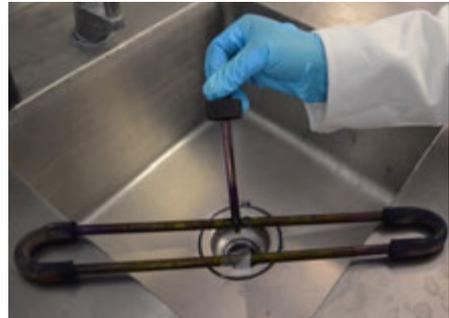


(A)



(B)

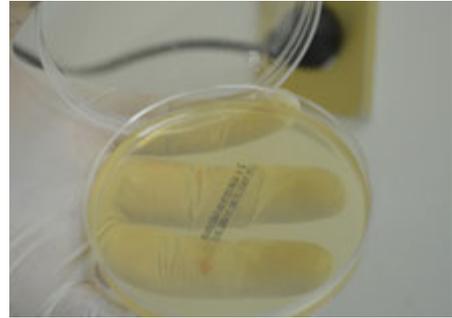
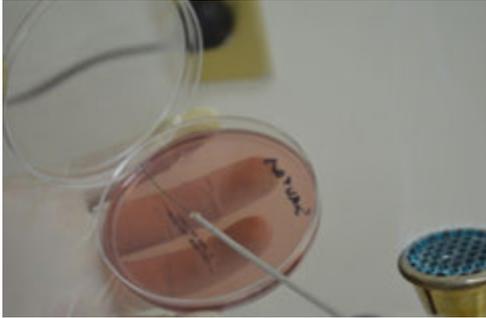
- 2) Realizar la tinción de Gram y Giemsa en el portaobjetos con la muestra fijada y observar en microscopio a objetivo seco fuerte e inmersión.



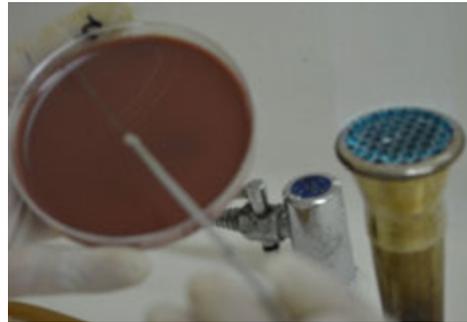
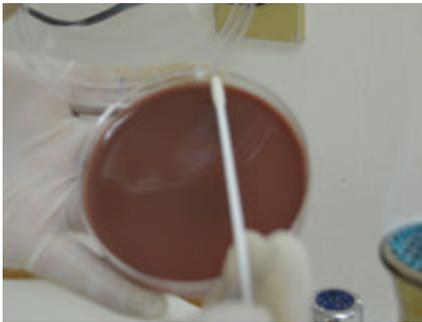
- 3) Realizar la siembra por aislamiento en los siguientes medios:

 Agar McConkey o EMB

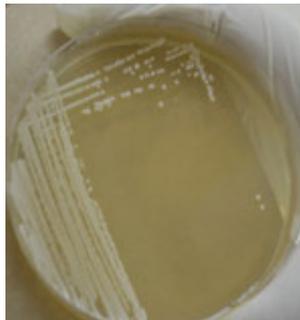
 Agar Sabouraud o PDA



- 4) Incubar las cajas de 35 a 37 °C durante 24 horas.
- 5) Del hisopo especial para gonococo y clamidia, sembrar en un extremo en el agar chocolate y después con un asa bacteriológica estéril sembrar por aislamiento e incubar de 35 a 37 °C por 24 horas.

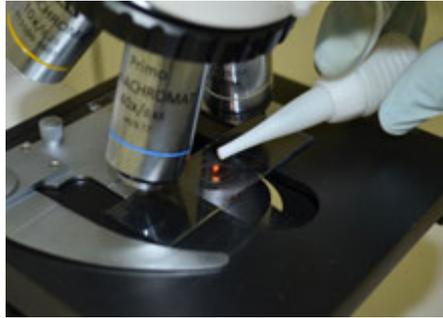


- 6) Observar las características morfológicas de cada uno de los medios inoculados.

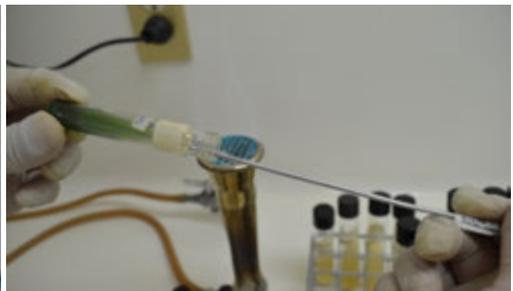
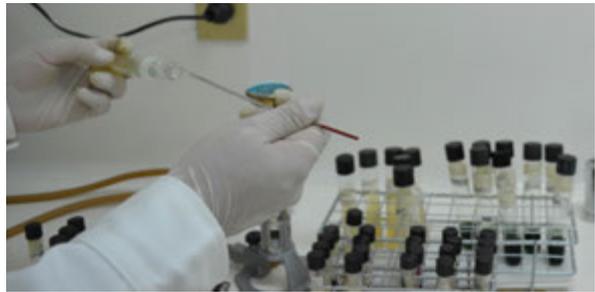




- 7) Realizar la tinción Gram de una colonia aislada del agar McConkey y agar chocolate. Observar al microscopio en objetivo seco fuerte (40X) e inmersión (100X).



- 8) Para las colonias aisladas de agar McConkey realizar las pruebas bioquímicas y pruebas especiales.





- 9) En las colonias aisladas en el Agar Sabouraud o PDA realizar la prueba de tubo germinal y clamidosporas. **(ANEXO VII)**
- 10) Incubar a 37 °C de 18 a 24 hrs. Posteriormente reportar los resultados en los formatos para el método tradicional. **(ANEXO I)**
- 11) Realizar el antibiograma para bacterias grampositivas y gramnegativas. Reportar en el formato de susceptibilidad a los antibióticos. **(ANEXO III)**

## **B) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO**

### **MEDIOS CROMOGENÍCOS**

#### **METODOLOGÍA**

<b>MATERIAL</b>	<b>MEDIOS DE CULTIVO</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Asa bacteriológica</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Crom CPS ID</li><li>• Crom Candida ID</li></ul>



- 1) Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio cromogénico. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa.



- 2) Incubar las placas en atmósfera aerobia a  $35 \pm 2$  °C durante 24 hrs en posición invertida. En caso de resultado negativo a las 24 hrs, incubar nuevamente durante 24 hrs más para registrar los resultados finales.



- 3) Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella, ya que la luz puede destruir los cromógenos.
- 4) Anotar el resultado correspondiente en el formato para medios cromogénicos y comparar con la literatura. (ANEXO II)

\* En caso de que no haya crecimiento o poco crecimiento, dejar incubando 24 hrs más en las mismas condiciones.



Crom CPS / *Escherichia coli*



Crom Candida / *Candida albicans*

### SISTEMA API 20E

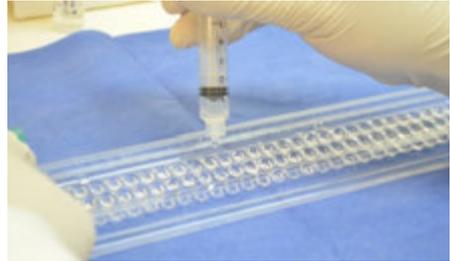
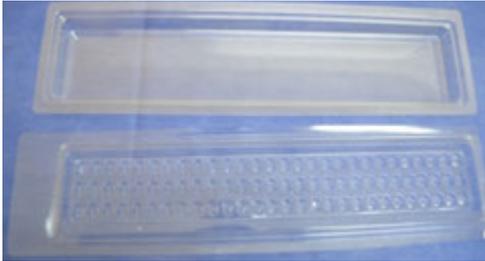
MATERIAL	REACTIVOS PARA REVELADO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kit API 20 E</li> <li>• Jeringa 1mL</li> <li>• Pipeta Pasteur</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FeCl<sub>3</sub> 10% (TDA)</li> <li>• KOH al 40% (VP1)</li> <li>• Naftol (VP2)</li> <li>• Kovacs o dimetilamino-cinamaldehído o reactivo de James.</li> <li>• Tetrafenilendiamina</li> <li>• NIT 1 y NIT 2</li> <li>• Zn</li> </ul>





## PREPARACIÓN DE LA TIRA

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.



- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).



- 3) Sacar una galería API 20 E de su envase individual.



- 4) Colocar la galería en la cámara de incubación.

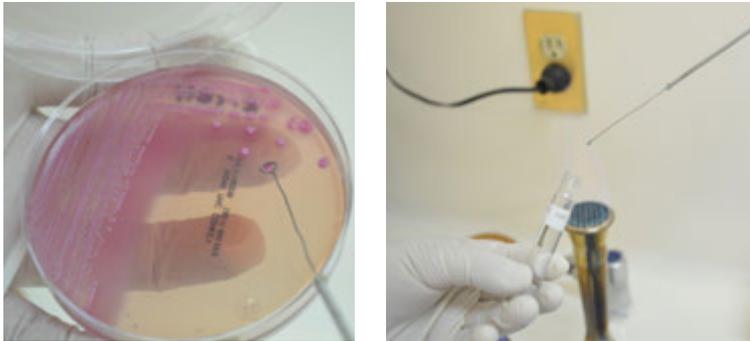


## PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 5) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Médium (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Médium (5 ml) o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.



- 6) A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, hacer una suspensión en 5 ml de solución salina (0.85% de NaCl) o 5 ml de agua estéril. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).



## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 7) Con la ayuda de la jeringa o pipeta Pasteur, introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos, colocar la punta de la jeringa sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia delante).



- 8) Llenar el tubo y la cúpula de los pocillos CIT\*, VP\*, GEL\* con la suspensión de bacterias evitando la formación de burbujas y apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula. Cada cúpula se llena hasta obtener un nivel horizontal o ligeramente convexo, nunca cóncavo para generar resultados correctos.



\*CIT= utilización del citrato

\*VP= producción de acetoina (Voges Proskauer)

\*GEL= gelatinasa (gelatina)

- 9) Para las otras pruebas, llenar únicamente los tubos (hasta el menisco).





**10)** Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos ADH\*, LDC\*, ODC\*, URE\*, H2S\* para obtener anaerobiosis.



\*ADH= Arginina-dihidrolasa

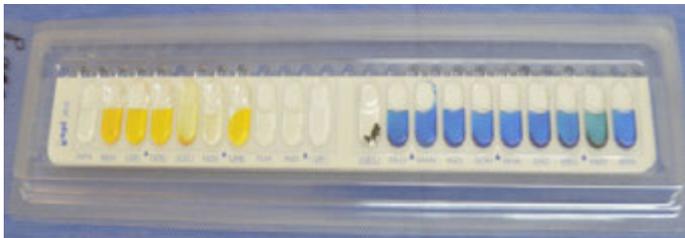
\*URE= Ureasa

\*LDC =Lisina Decarboxilasa

\* H2S= Producción de H2S

\*ODC=Ornitina Decarboxilasa

**11)** Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación y cerrar las cámaras de incubación.



**12)** Incubar a 37 °C durante 18-24 horas.





## LECTURA E INTERPRETACIÓN

**13)** Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. **(ANEXO II)**



**14)** Determinadas pruebas requieren ser reveladas, para el revelado se tienen que tener en cuenta dos criterios:

- 🧪 Si la glucosa da negativo y los test positivos son dos o menos de dos, no hay que añadir reactivos.
- 🧪 Si la glucosa es positiva y/o tres o más test son positivos se revelan los test que requieren reactivos:

**TDA:** añadir una gota de  $\text{FeCl}_3$  10% (una gota del reactivo TDA)

Positivo= color marrón oscuro





**VP:** añadir una gota del reactivo VP1 y una gota del reactivo VP2

Positivo= color rosa fuerte o rojo en 5-10 minutos.

Negativo= color rosa débil después de los 10 minutos.



**IND:** añadir una gota de reactivo de Kovacs<sup>1</sup> o dimetilamino-cinamaldehído <sup>2</sup>. O reactivo de James <sup>3</sup> Dependiendo del reactivo utilizado pueden darse las posibilidades siguientes:

<sup>1</sup>Positivo= aparece un anillo rosa-rojo.

<sup>2</sup>Positivo= color de rosa a morado en todo el pocillo.

<sup>3</sup>Positivo= rosa



**Oxidasa:** es la prueba número 21 y se realiza de forma independiente a la tira. Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

Positivo= color azul que aparece inmediatamente.



Reducción de los nitratos en nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y en nitrógeno ( $\text{N}_2$ ): añadir una gota de los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos.

Positivo ( $\text{NO}_2$ )= coloración roja



Negativo= coloración amarilla, puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de micro-burbujas): agregar de 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula GLU. Después de 5 minutos, si el color sigue siendo **amarillo**, indica una reacción **positiva** ( $\text{N}_2$ ).

Negativo= coloración naranja-rojizo de la cúpula, ya que los nitratos aún presentes en el tubo han sido reducidos a nitritos por el Zinc.



**15)** Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o triplete (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa).

Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 o 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

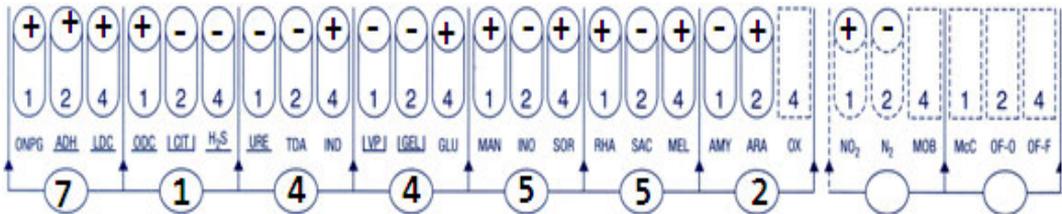
-  Si la reacción es negativa en un pocillo se pone 0.
-  Si la reacción es positiva en el primer pocillo se escribe 1, si es positiva en el segundo pocillo se escribe 2 y si es positivo en el tercero se escribe 4 obteniendo un triplete.
-  Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata. <sup>(7,8,9)</sup>





**16)** Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato. (ANEXO II)

<p>ONPG ADH LDC</p>	<p>ODC CIT H2S</p>	<p>URE TDA IND</p>
<p>VP GEL GLU</p>	<p>MAN INO SOR</p>	<p>RHA SAC MEL</p>
<p>AMY ARA OX NO2 N2</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p><b>PERFIL NUMÉRICO DE 7 CIFRAS: 7144552</b></p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p><b>IDENTIFICACIÓN:</b></p> </div>	





## API 20C AUX

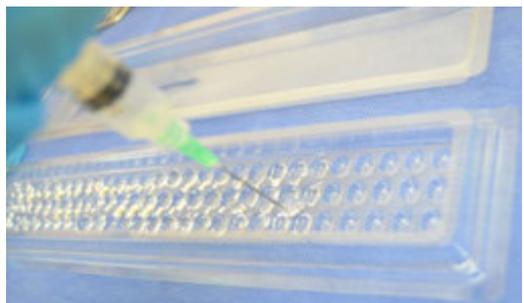
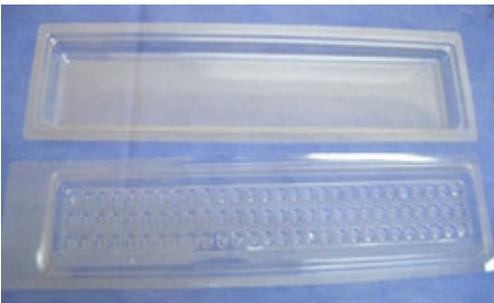
### METODOLOGÍA

MATERIAL	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Kit API 20C AUX</li><li>• Micropipeta de 100µl</li><li>• Solución fisiológica de NaCl al 0.85%</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Patrón 2 de MacFarland</li><li>• Ampolla API C Médium</li></ul>



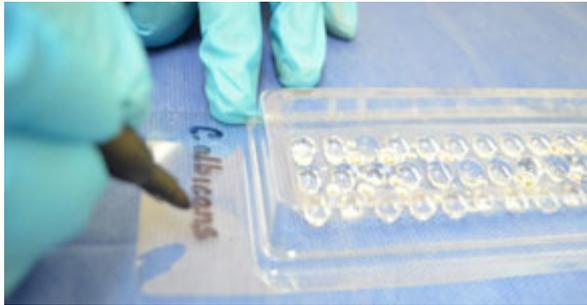
### PREPARACIÓN DE LA GALERÍA

- 1) Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada [o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles de liberar gases (Ej.: Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.)] en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.





- 2) Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar desplazada durante la manipulación).



- 3) Retirar la galería de su envase individual y depositarla en la cámara de incubación.

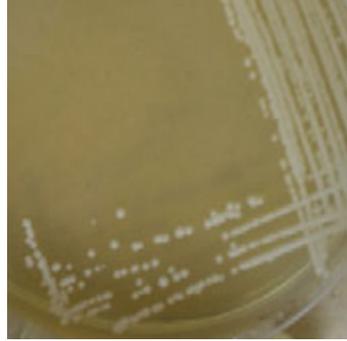
#### **PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

- 4) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Médium o una solución estéril que contenga la misma solución sin aditivos.

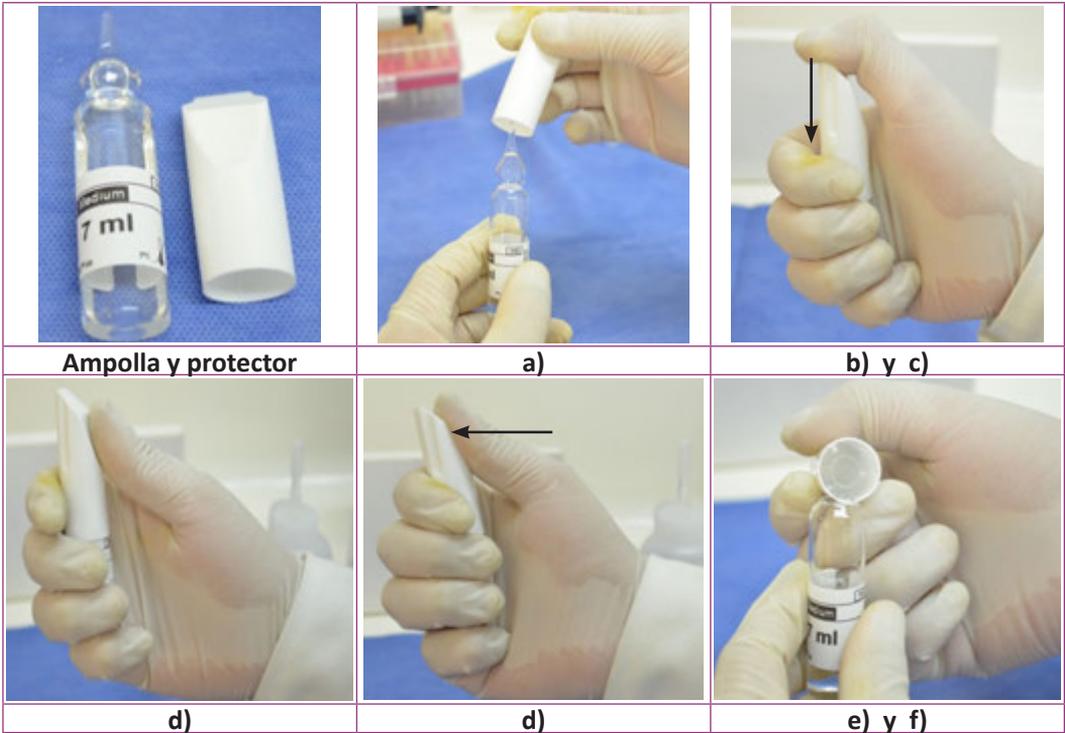




- 5) A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión de levaduras de turbidez igual a la del patrón 2 de McFarland. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.



- 6) Abrir una ampolla de API C Médium:
- Introducir la ampolla en el protector de ampolla.
  - Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - Presionar a fondo el tapón blanco.
  - Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
  - Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
  - Retirar delicadamente el tapón.



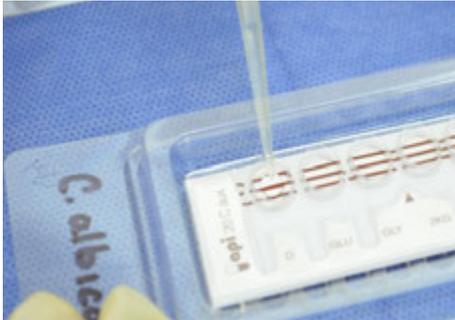
- 7)** Con la ayuda de la micropipeta, transferir 100 microlitros de la suspensión de levaduras a una ampolla de C Médium y homogeneizar con la micropipeta evitando la formación de burbujas.



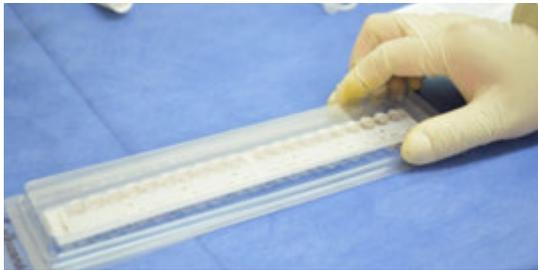


## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 8) Llenar las cúpulas con la suspensión obtenida en el API C Médium. Evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula. Cuidar que se cree un nivel horizontal o ligeramente convexo pero jamás cóncavo. Las cúpulas parcial o excesivamente llenas son causa de resultados incorrectos.



- 9) Volver a cerrar la cámara de incubación e incubar 48-72 horas ( $\pm 6$  horas) a  $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



## LECTURA DE LA GALERÍA

Después de 48 horas de incubación, o de 72 horas (si los ensayos, no resultan muy claros después de 48 horas), observar el crecimiento de las levaduras comparativamente con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula con mayor turbidez que la de control nos indica una reacción positiva que ha de ser anotada en la hoja de resultados.

Con el fin de evitar toda contaminación durante una reincubación, levantar la tapa exclusivamente durante el período de lectura.

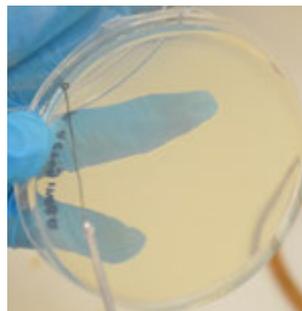


**SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS**

**EQUIPO Y REACTIVOS**

MATERIAL	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Multidiscos Gram positivos y Gram negativos</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Mechero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Müller Hinton</li> </ul>

- 1) En una placa de MH inocular en todo el medio el microorganismo identificado, a partir de una colonia perfectamente aislada.





- 2) Colocar los multidiscos sobre el agar sembrado con la cepa aislada e incubar la placa de 35 a 37 °C por 23 horas.



- 3) Realizar la lectura del antibiograma, utilizando la hoja para susceptibilidad a antibióticos suministrada por el proveedor. <sup>(11)</sup> (ANEXO III)



- 4) Anotar los resultados en el formato de resultados (ANEXO III). Se colocará el nombre del microorganismo patógeno identificado, así como la susceptibilidad a antibióticos en el formato de resultados: informe del laboratorio. (ANEXO IV)

## V.I Fase Postanalítica

Los resultados e interpretación se anotarán en el formato de Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas (ANEXO IV). Se colocará el nombre del microorganismo(s) patógeno(s) identificado(s), así como la susceptibilidad a antibióticos en dicho formato.

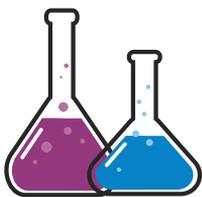


## **VI. Referencias**

1. Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. 12º Edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009.
2. Spicer W. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. Texto y atlas en color. 2a ed. Barcelona: Elsevier; 2009
3. Organización mundial de la salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3º ed. Ginebra, 2005. [223 páginas]. Disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
4. Lloret AC. Garantía de calidad en los laboratorios de microbiología clínica de la comunidad Valenciana: Manual de toma de muestras. Barcelona: Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat; 2004. Disponible en: <http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/documentos/V.3939-2004.pdf>
5. García del Valle A. Manual de Microbiología Médica. 2ª ed. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 2010.
6. Biomeriux. Medios cromogénicos chromID. 2021. Disponible en: <https://www.biomeriux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/linea-chromidr>
7. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop P., Schreckenberger P., Woods G. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. 6 ed. Médica Panamericana: Buenos Aires; 2008.
8. bioMérieux. API® 20 E, Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes. bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomeriux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
9. . bioMérieux. API® 20 Staph, Sistema de identificación de estafilococos, micrococos y géneros relacionados. bioMérieux; 2009. Recuperado de: <https://www.biomeriux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
10. Biorad. Discos para comprobar la susceptibilidad a los antibióticos. Biorad 2010; [7 páginas]. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/>



11. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 (jalisco.gob.mx)



# Unidad Aparato Genitourinario

## PRÁCTICA 9 Diagnóstico de infecciones del tracto genital masculino mediante el exudado uretral



**Elaborado por:**

Q.F.B. Antonio Avilés Villada

Q.F.B. Georgina Bermejo Torres

Dr. Roberto Cruz González Meléndez



# Índice

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>359</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>361</b>
<b>III. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>361</b>
<b>IV. PROPÓSITO DEL EXAMEN</b>	<b>362</b>
<b>V. METODOLOGÍA</b>	<b>363</b>
V.1 Fase Preanalítica	363
V.2. Fase Analítica	370
V.3. Fase Postanalítica	398
<b>VI. REFERENCIAS</b>	<b>399</b>



## I. Introducción

Las infecciones en la uretra se deben principalmente a microorganismos de transmisión sexual como *Neisseria gonorrhoeae*, sin embargo, es posible encontrar infecciones por enterococos y estreptococos del grupo B. <sup>(4)</sup>

La gonorrea o la infección por clamidias en el varón por lo general se evidencian por la presencia de secreción uretral, mientras que las mujeres con cualquiera de estas dos infecciones o con ambas pueden tener síntomas mínimos o carecer de ellos. <sup>(1)</sup>

Los dos principales tipos de uretritis infecciosa son **gonorrea** y la llamada uretritis inespecífica (UI) o la **uretritis no gonocócica (UNG)**.

La gonorrea se debe a infección con *Neisseria gonorrhoeae*. Este microorganismo patógeno sólo infecta al ser humano y se propaga de una persona a otra, por lo general mediante el contacto sexual. No subsiste bien fuera del huésped humano.

La **UNG** obedece a dos causas principales: *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma genitalium*.

Además de estas enfermedades de transmisión sexual, la uretritis bacteriana (*Escherichia coli*, especies de *Klebsiella*, *S.aureus*) se da en caso de sondas, estenosis e infecciones urinarias, entre las que se incluye prostatitis. <sup>(2)</sup>

La secreción por la uretra varía desde escasa, clara o mucopurulenta, sobre todo en la UNG, hasta pus abundante de color amarillo o amarillo verdoso, sobre todo en la gonorrea.

Disuria significa dolor al orinar y es resultado directo de la infección y una inflamación de la uretra. Varía desde leve, sobre todo en la UNG, hasta extremadamente grave sobre todo en las infecciones gonocócicas. Cuando hay secreción uretral profusa, sobre todo en los varones, puede recolectarse en forma externa sin introducir dispositivo alguno para la toma de la muestra dentro de la uretra. Sin embargo, para la investigación de clamidias en los varones la muestra debe recolectarse con un hisopo uretral. Para detectar gonococos en los varones también se han utilizado con buenos resultados unas gotas de la primera parte de la orina emitida.



Las muestras genitales se obtienen de zonas altamente colonizadas por flora comensal por lo que la selección de las muestras y los métodos de obtención son críticos. La supuración espontánea no es una muestra válida por el alto número de comensales y las dificultades de la interpretación de los cultivos. Los agentes productores de infecciones genitales en el hombre tienen un área específica (2-3 cm en el interior de la uretra) donde la rentabilidad es mayor. <sup>(1)</sup>

Esta práctica tiene como apoyo el simulador uretral masculino el cual ayudará a identificar la zona y realizar una correcta toma de muestra, para posteriormente, aplicar la metodología tradicional y moderna de diagnóstico clínico tomando en cuenta las medidas de bioseguridad del laboratorio para poder obtener un resultado confiable. Para la metodología tradicional se utilizarán medios de cultivo tradicionales y pruebas bioquímicas. Para la metodología moderna se utilizarán medios cromogénicos y sistema API. Ambas prácticas tendrán como control de calidad cepas puras bacterianas.

El diseño de esta práctica está encaminada a que el alumno observe de manera gráfica y sencilla los pasos para realizar una correcta toma de muestra y, a su vez, sea reproducible en cualquier laboratorio clínico. Por tal motivo y con fines de control de calidad, las prácticas se dividirán en tres etapas: preanalítica, analítica y postanalítica.

**Etapas preanalítica:** se establecen las condiciones del paciente para una buena toma de muestra, se recaba información del paciente como datos personales y clínicos necesarios, además se establecen las condiciones para la obtención de la muestra con la mejor calidad que preserve la integridad de la misma.

**Etapas analítica:** se describen los métodos de laboratorio empleados en esta área, los cuales son explicados de manera clara, precisa y sencilla para ser llevados a cabo por el personal del área que lo consulte y lograr la correcta ejecución de las pruebas ya que en esta etapa se exigen técnicas estandarizadas, equipos adecuados bien calibrados y reactivos.

**Etapas postanalítica:** se refieren los resultados obtenidos y se especifican en el informe del laboratorio, al cual se llega partiendo de que las fases preanalítica y analítica son realizadas con el rigor técnico y científico exigido por un sistema de gestión de la calidad.

Cabe señalar que al final de la práctica se realizó un cuestionario que tiene por objetivo validar la utilidad de la misma, y con las opiniones de alumnos y profesores establecer un proceso de mejora continua de esta práctica.



## II. Objetivos

-  Realizar una correcta toma de muestra de exudado uretral utilizando el modelo anatómico masculino.
-  Aplicar los procedimientos tradicional y alternativo para la identificación de microorganismos encontrados en infecciones que afectan la zona uretral.
-  Utilizar los agares cromogénicos como métodos alternativos de diagnóstico.
-  Utilizar las cepas puras como control de calidad para el método tradicional y alternativo.

## III. Medidas de bioseguridad<sup>(3)</sup>

De acuerdo a la OMS, el nivel de seguridad para un laboratorio de enseñanza básica e investigación es nivel 1, como el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas de la FES Zaragoza, por lo tanto, las medidas de seguridad para este nivel son:

-  Las puertas del laboratorio se mantendrán cerradas.
-  No se autorizará ni permitirá la entrada de niños en las zonas de trabajo del laboratorio.
-  Se usarán en todo momento batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
-  Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan implicar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados.
-  No se usará calzado abierto.
-  En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
-  Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.



- 🧪 No se colocará ningún material en la boca ni se pasará la lengua por las etiquetas.
- 🧪 Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al supervisor del laboratorio.
- 🧪 Los líquidos contaminados deberán descontaminarse (por medios químicos o físicos).
- 🧪 El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- 🧪 Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso y al final de cada jornada de trabajo.

### Manipulación de desechos:

- 🧪 Seguir los criterios estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-2002, Protección ambiental – Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. <sup>27</sup>



## IV. Propósito del examen

El diseño de esta práctica va encaminada a efectuar una toma de muestra apropiada para realizar el diagnóstico microbiológico de patógenos que producen la infección en el tracto genital masculino, específicamente la zona uretral, utilizando dos métodos: alternativo (medios cromogénicos y sistema API) y tradicional, empleando cepas puras como control de calidad.



## **V. Metodología**

Se utilizarán dos métodos: método tradicional y el método alternativo de diagnóstico (sistema API 20 y medios cromogénicos). Con fines de control de calidad, la práctica se dividirá en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

### **V.I. Fase Preanalítica**

#### **PREPARACIÓN DEL PACIENTE**

Se le informa al paciente que no orine por lo menos una hora antes de la toma de muestra.

En casos de un exudado mucopurulento abundante [probable gonorrea], tomar el exudado con el hisopo sembrar de inmediato en una placa de agar de Thayer Martin de no ser posible depositarlo en el medio de transporte de Stuart.

Ante la sospecha de infección por Chlamydia, introducir el hisopo de 2 a 4 cm en la uretra, frotar las paredes y girar el hisopo durante 5 a 10 segundos. Con esta muestra hacer de inmediato tres frotos en portaobjetos limpios y fijarlos con acetona.

#### **CRITERIOS DE RECHAZO PARA TOMAR LA MUESTRA**

Que se haya aplicado pomadas en la uretra.

#### **IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA**

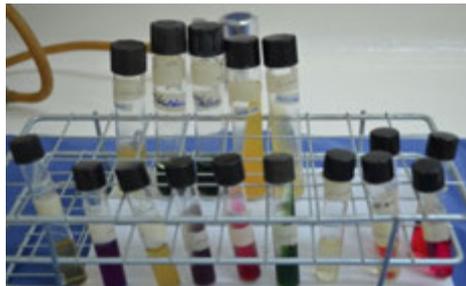
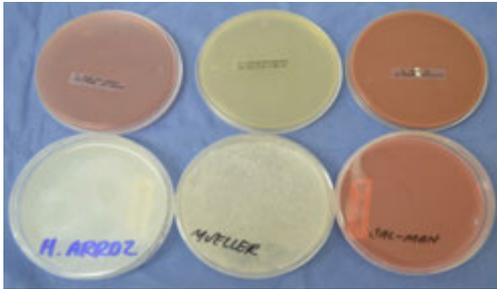
Los recipientes donde se va a tomar la muestra deben estar identificados. Etiquetar la muestra con los siguientes datos:

Nombre completo o iniciales empezando con el apellido, número de registro, fecha y tipo de muestra de que se trata.



EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL Y EQUIPO	REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	REVELADORES PARA PRUEBAS BIOQUÍMICAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Portaobjetos</li> <li>• Cubreobjetos</li> <li>• Guantes desechables</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Mechero</li> <li>• Hisopos de alginato o dacrón estériles</li> <li>• Gasas estériles</li> <li>• Lámpara</li> <li>• Autoclave</li> <li>• Microscopio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colorantes para tinción de Gram:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cristal violeta</li> <li>- Lugol</li> <li>- Alcohol-Cetona</li> <li>- Safranina</li> </ul> </li> <li>• Aceite de inmersión</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Chocolate</li> <li>• Agar Thayer-Martin</li> <li>• Agar McConkey</li> <li>• Agar PDA o Sabouraud</li> <li>• Agar Müeller Hinton</li> <li>• Medio de transporte Stuart</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citrato de Simmon's</li> <li>• Fenilalanina desaminasa</li> <li>• LIA</li> <li>• MIO</li> <li>• SIM</li> <li>• TSI</li> <li>• Urea de Christensen</li> <li>• Caldo nitrato con campana</li> <li>• Caldo RM-VP</li> <li>• O/F Hugh Leifson con/sin sello de nujol</li> <li>• Rojo de fenol + CHO's</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cloruro férrico</li> <li>• Alfa naftilamina</li> <li>• Ácido sulfanílico</li> <li>• Alfa naftol</li> <li>• KOH 30%</li> <li>• Prueba de la catalasa</li> <li>• Prueba de la coagulasa</li> <li>• Reactivo de Kovacs</li> </ul>



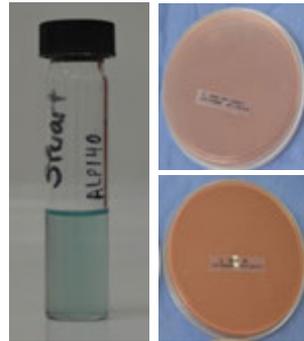


**PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA**

- 1) Realizar la identificación positiva del paciente.



- 2) Etiquetar el medio de transporte o los medios seleccionados, con la clave del paciente.



- 3) Explicarle el procedimiento.





- 4) La persona que va a tomar la muestra se coloca el cubrebocas y después guantes.



- 5) El paciente permanecerá de pie durante la toma de muestra.



- 6) Proporcionarle al paciente un par de guantes y pedirle que se los ponga.





- 7) Solicitarle al paciente que se descubra dejando al descubierto la uretra (la parte donde orina) y retraiga el prepucio (en caso de no estar circuncidado), lo mantenga así durante todo el procedimiento.



- 8) Presionar la uretra ligeramente con el fin de que expulse secreción la cual se colecta con un hisopo de algodón.



- 9) Introducir el hisopo de alginato de 2 a 4 cm dentro de la uretra, con movimientos rotatorios para facilitar la inserción.

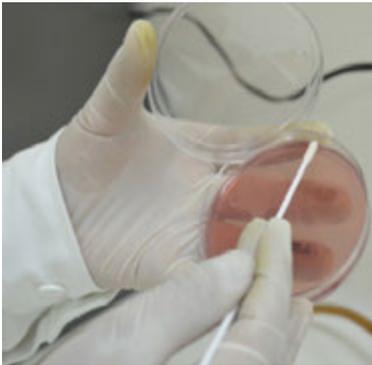




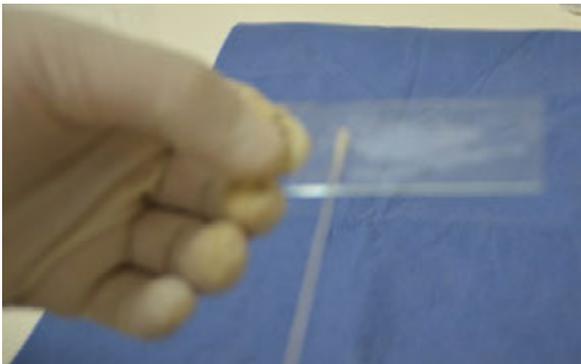
- 10)** Una vez dentro, rotar suavemente el hisopo haciendo suficiente presión para asegurar que el hisopo este en contacto de la superficie uretral de 3 a 5 segundos.



- 11)** Inocular con el hisopo directamente en un extremo de cada uno de los medios de cultivo.



- 12)** Realizar una impronta de la uretra rotando suavemente sobre el portaobjetos. Después fijarlo con metanol.





- 13)** Este hisopo se introduce en el medio de transporte específico, se corta el mando con la finalidad de cerrar el vial dejando el hisopo dentro.



- 14)** Avisar al paciente que se puede vestir y hemos terminado.



### **TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN**

-  No refrigerar las muestras, especialmente si se sospecha de *N. gonorrhoeae*.
-  El transporte debe ser inmediato.
-  Cuando no puedan procesarse las muestras antes de 15 minutos, se utilizarán torundas con medio de transporte Stuart-Amies que se mantendrán a temperatura ambiente o preferentemente en la estufa a 35-37 °C.
-  Las muestras se procesarán siempre que se pueda antes de 3 horas, y como máximo en un plazo de 6-12 horas.



## PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Los medios se deben inocular comenzando por el medio más general hasta el más selectivo (primero agar chocolate y posteriormente agar Thayer-Martin y agar Sabouraud). El cultivo en agar chocolate debe hacerse junto con el medio Thayer-Martin o similar debido a que algunos gonococos pueden inhibirse por la vancomicina que contiene el medio.

## OBSERVACIONES

La muestra ha de recogerse preferentemente antes de la primera micción de la mañana, si no es posible, se deberá esperar al menos una hora tras la última micción para recogerla.

## V.2. Fase Analítica

**TABLA 1.** Procedimiento de los métodos tradicional y alternativo.

Método tradicional		Método alternativo de diagnóstico	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
<b>Inocular aislamiento en los medios de cultivo:</b> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Agar Chocolate</li> <li>2. Agar Thayer-Martin</li> <li>3. Agar EMB o McConkey</li> <li>4. Agar Sabouraud o PDA</li> </ol> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Se incuban a 37 °C durante 24 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Después de la incubación describir la morfología colonial para cada medio de cultivo sembrado.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Realizar la tinción de Gram.</p>		<b>Medios cromogénicos</b> <p>Extender la muestra para aislamiento en los siguientes medios cromogénicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* Crom Staph ID</li> <li>* Crom CPS ID</li> <li>* Crom Candida ID</li> </ul> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Incubar las placas en atmósfera aerobia a 35 ± 2 °C durante 24 horas.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella.</p>	



Método tradicional		Método alternativo de diagnóstico	
Origen de la muestra a analizar			
Cepas	Muestra clínica	Cepas	Muestra clínica
	<p>↓</p> <p>Para las colonias en McConkey realizar las siguientes pruebas bioquímicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* SIM</li> <li>* MIO</li> <li>* TSI</li> <li>* LIA</li> <li>* Urea</li> <li>* Citrato de Simmons</li> </ul> <p>↓</p> <p>Incubar a 37 °C por 18-24 horas. Posteriormente leer.</p> <p>↓</p> <p>En las colonias formadas en agar papa dextrosa realizar la prueba de tubo germinal.</p> <p>↓</p> <p>Efectuar Antibiograma de bacterias patógenas encontradas y reportar..</p>		<p>↓</p> <p>Observar las colonias aisladas, comparar con la literatura y reportar.</p> <p>↓</p> <p>Realizar el llenado de las galerías de API 20 con una cepa problema en:</p> <p>↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* API20 Staph</li> <li>* API 20 E</li> <li>* API 20 C AUX</li> </ul>

**DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO TRADICIONAL**

1) Realizar la siembra por aislamiento en los siguientes medios de cultivo:

 Agar Chocolate

 Agar Thayer-Martin

 Agar EMB o McConkey

 Agar Sabouraud o PDA



Agar chocolate



Agar McConkey



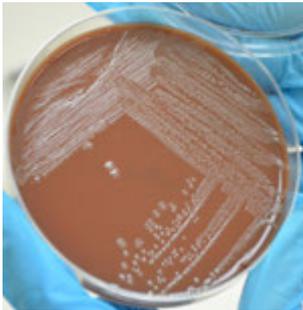
Agar Sal y manitol



- 2) Incubar las cajas de 35 a 37 °C durante 24 horas.



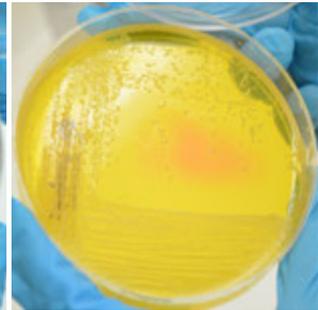
- 3) Observar las características morfológicas de cada uno de los medios inoculados.



Agar Chocolate /  
*Escherichia coli*

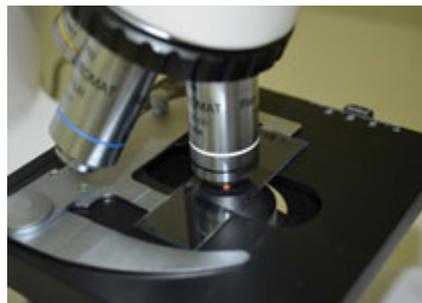


Agar McConkey /  
*Klebsiella pneumoniae*



Agar Sal y manitol /  
*Staphylococcus aureus*

- 4) Realizar la tinción de Gram de los medios inoculados a partir de una cepa aislada. Observar al microscopio en objetivo seco fuerte (40X) e inmersión (100X).





- 5) Para las colonias aisladas de agar McConkey realizar las pruebas bioquímicas y pruebas especiales.



- 6) En las colonias aisladas en el Agar Sabouraud o PDA realizar la prueba de tubo germinal y clamidosporas y anotar los resultados. **(ANEXO VII)**
- 7) Incubar a 37 °C de 18 a 24 hrs. Posteriormente reportar los resultados en los formatos para el método tradicional. **(ANEXO I)**
- 7) Realizar el antibiograma para bacterias grampositivas y gramnegativas. Reportar en el formato de susceptibilidad a los antibióticos. **(ANEXO III)**



## B) DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ALTERNATIVO DE DIAGNÓSTICO

### MEDIOS CROMOGENICOS

### METODOLOGÍA

MATERIAL	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Asa bacteriológica</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Crom Staph ID</li><li>• Crom CPS ID</li><li>• Crom Candida ID</li></ul>



- 1) Extender la muestra para aislamiento en la superficie del medio cromogénico. Si la muestra se cultiva de una torunda, hacerla girar sobre una superficie pequeña de la superficie cercana al borde, para luego extenderla a partir de dicha zona con un asa.





- 2) Incubar las placas en atmósfera aerobia a  $35 \pm 2$  °C durante 24 hrs en posición invertida. En caso de resultado negativo a las 24 hrs, incubar nuevamente durante 24 hrs más para registrar los resultados finales.



- 3) Reducir al mínimo la exposición a la luz antes de la incubación y durante ella, ya que la luz puede destruir los cromógenos.
- 4) Anotar el resultado correspondiente en el formato para medios cromogénicos y comparar con la literatura. **(ANEXO II)**

\* En caso de que no haya crecimiento o poco crecimiento, dejar incubando 24 hrs más en las mismas condiciones.



Crom CPS /  
*Escherichia coli*



Crom Stap /  
*Staphylococcus aureus*



Crom Candida /  
*Candida albicans*



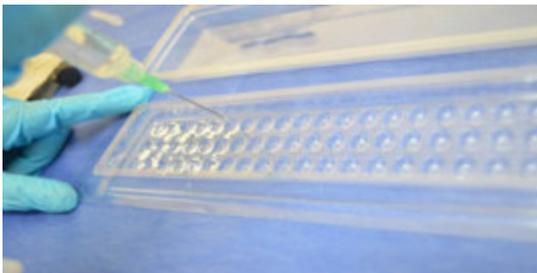
### SISTEMA API20 STAPH

MATERIAL	REACTIVOS PARA REVELADO DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Kit API Staph</li><li>• Jeringa de 1ml estéril o pipeta Pasteur estéril</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• VP1</li><li>• VP2</li><li>• NIT1</li><li>• NIT2</li><li>• ZYM A</li><li>• ZYM B</li></ul>



### PREPARACIÓN DE LA TIRA

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.





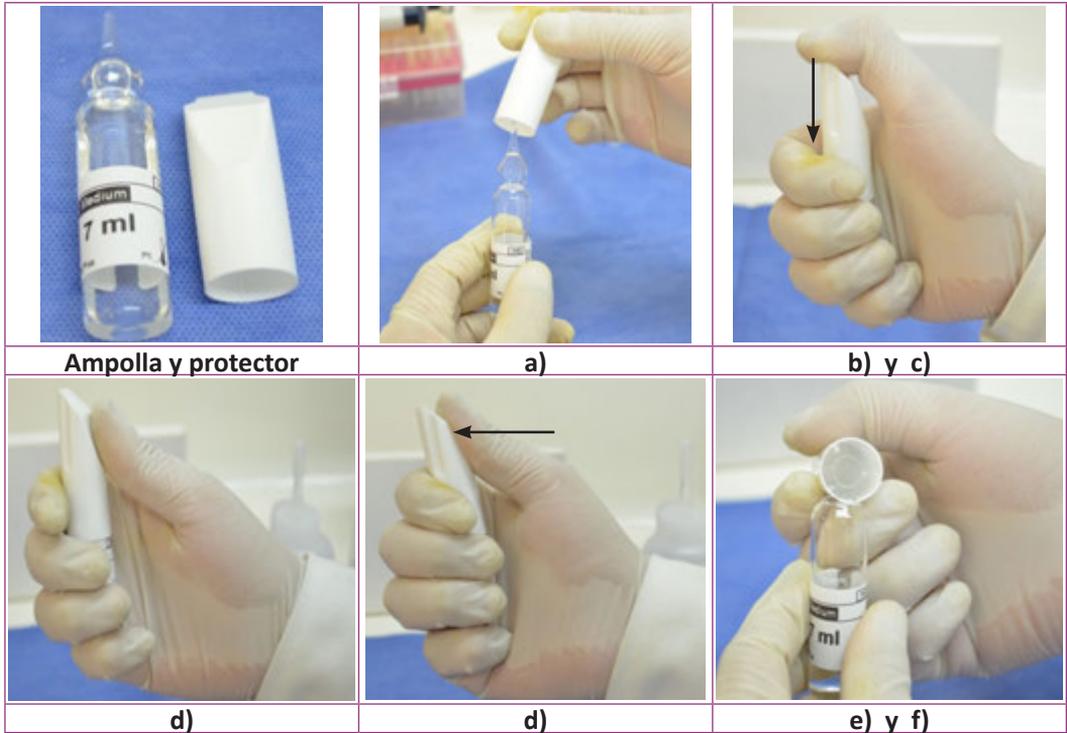
- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).
- 3) Sacar una galería API Staph de su envase individual.



- 4) Colocar la galería en la cámara de incubación.

#### **PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

- 5) Abrir una ampolla de API Staph Médium:
  - a) Introducir la ampolla en el protector de ampolla.
  - b) Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
  - c) Presionar a fondo el tapón blanco.
  - d) Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
  - e) Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
  - f) Retirar delicadamente el tapón.



- 6) A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, preparar una suspensión bacteriana homogénea con una turbidez equivalente a 0.5 McFarland. Se recomienda utilizar cultivos jóvenes (18-24 horas). Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.



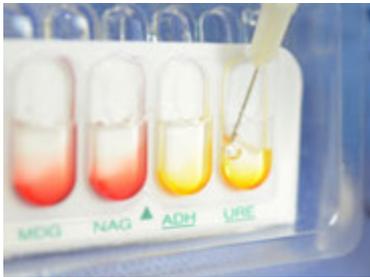


### INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 7) Con la ayuda de una pipeta o jeringa, rellenar la galería con API Staph Médium. Rellenar solamente los microtubos y no las cúpulas, sin sobrepasar el nivel del tubo. Para evitar la formación de burbujas, inclinar la cámara de incubación hacia delante y colocar la punta de la pipeta en el borde de la cúpula.



- 8) Crear anaerobiosis en las pruebas de ADH\* y URE\*, llenando las cúpulas con aceite mineral para formar un menisco convexo.



\*ADH= Arginina dihidrolasa

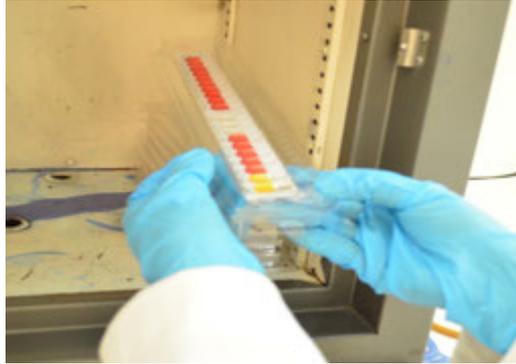
\*URE= Ureasa

- 9) Cerrar la cámara de incubación.





10) Incubar durante 18-24 horas a  $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### LECTURA DE LA GALERÍA

11) Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados.

La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO II)

12) Después del periodo de incubación, el desarrollo de las reacciones se dará por la adición de 1 gota de cada uno de los siguientes reactivos y a continuación se interpretan todas las reacciones conforme a la tabla de identificación:

**Prueba NIT:** Reactivos NIT 1 y NIT 2.

Esperar 10 minutos. Un color rojo indica una reacción positiva.





**Prueba VP:** Reactivos VP 1 y VP 2:

Esperar 10 minutos. Un color violeta-rosáceo indica una reacción positiva.

Un color rosa pálido o rosa claro obtenido después de 10 minutos debe ser considerado como nvegativo.



**Prueba PAL:** Reactivos ZYM A y ZYM B (\*).

Esperar 10 minutos. Un color violeta indica una reacción positiva.

(\* Se recomienda controlar cada ampolla de reactivo ZYM B antes de la 1ª utilización.





### DETERMINACIÓN DEL PERFIL NUMÉRICO E IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

**13)** Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres; en total tenemos 7 grupos o tripletes. Para obtener el perfil numérico de 7 cifras se darán valores de 0, 1, 2 y 4 de acuerdo a los siguientes criterios:

-  Si la reacción es negativa en un pocillo se pone 0.
-  Si la reacción es positiva en el 1º pocillo se pone 1, si es positivo en el 2º se pone 2 y si es positivo en el 3º se pone 4, obteniendo un triplete.
-  Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata. <sup>(9.11.12)</sup>



**14)** Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato para API 20 Staph. (ANEXO II)

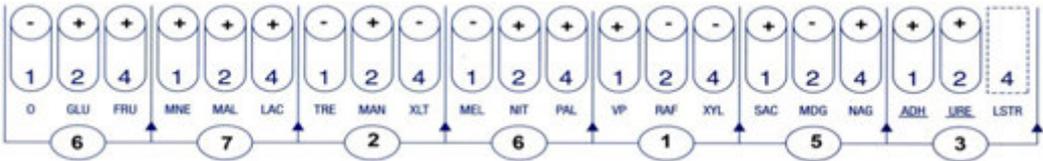
		
0 GLU FRU	MNE MAL LAC	TRE MAN XLT
		
MEL NIT PAL	VP RAF XYL	SAC MDG NAG



ADH URE LSTR

**PERFIL NUMÉRICO DE 7 CIFRAS:** 6726153

**IDENTIFICACIÓN:**



**API 20**

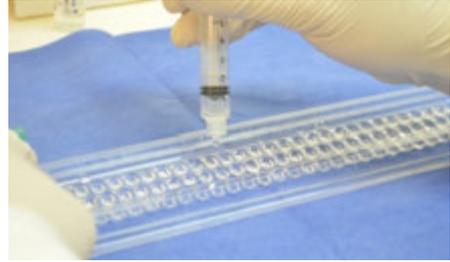
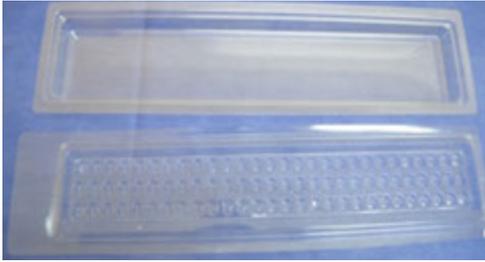
MATERIAL	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kit API 20 E</li> <li>• Jeringa 1ml</li> <li>• Pipeta Pasteur</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FeCl<sub>3</sub> 10% (TDA)</li> <li>• KOH al 40% (VP1)</li> <li>• Naftol (VP2)</li> <li>• Kovacs o dimetilamino-cinamaldehído o reactivo de James.</li> <li>• Tetrafenilendiamina</li> <li>• NIT 1 y NIT 2</li> <li>• Zn</li> </ul>





## PREPARACIÓN DE LA TIRA

- 1) Prepare una caja de incubación (bandeja y tapa) y distribuir aproximadamente 5 ml de agua destilada o agua desmineralizada (o cualquier agua sin aditivos o productos químicos que puedan liberar gases como  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , etc.) en el panel de pocillos de la bandeja para crear una atmósfera húmeda.



- 2) Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar extraviada durante la manipulación).



- 3) Sacar una galería API 20 E de su envase individual.



- 4) Colocar la galería en la cámara de incubación.



## PREPARACIÓN DEL INÓCULO

- 5) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Médium (5 ml) o una ampolla de API Suspensión Médium (5 ml) o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril o de agua destilada estéril, sin aditivos.

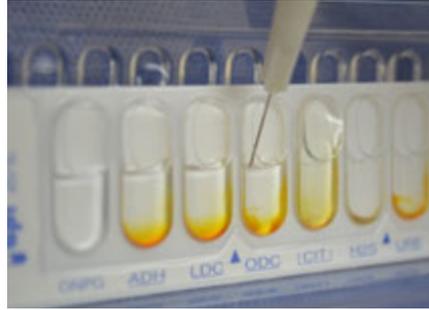


- 6) A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, hacer una suspensión en 5 ml de solución salina (0.85% de NaCl) o 5 ml de agua estéril. Utilizar preferentemente cultivos jóvenes (18-24 horas).



## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 7) Con la ayuda de la jeringa o pipeta Pasteur, introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los tubos), colocar la punta de la jeringa sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia delante.



- 8) Llenar el tubo y la cúpula de los pocillos CIT\*, VP\*, GEL\* con la suspensión de bacterias evitando la formación de burbujas y apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula. Cada cúpula se llena hasta obtener un nivel horizontal o ligeramente convexo, nunca cóncavo para generar resultados correctos.



\*CIT= utilización del citrato

\*VP= producción de acetoína (Voges Proskauer)

\*GEL= gelatinasa (gelatina)

- 9) Para las otras pruebas, llenar únicamente los tubos (hasta el menisco).





**10)** Cubrir con parafina las cúpulas de los pocillos ADH\*, LDC\*, ODC\*, URE\*, H2S\* para obtener anaerobiosis.



\*ADH= Arginina-dihidrolasa

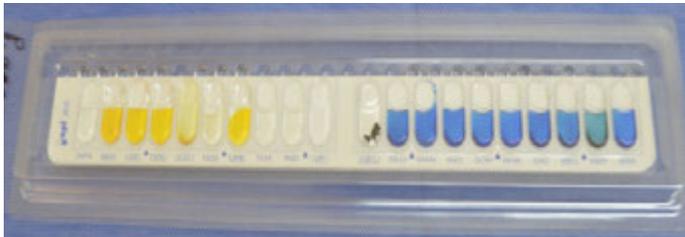
\*URE= Ureasa

\*LDC =Lisina Decarboxilasa

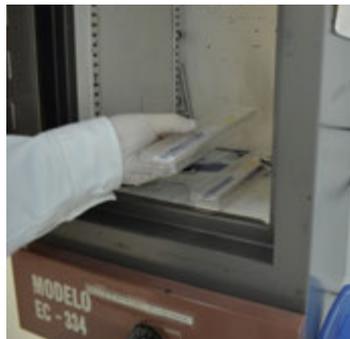
\* H2S= Producción de H2S

\*ODC=Ornitina Decarboxilasa

**11)** Poner la tira en su propia cámara húmeda de incubación y cerrar las cámaras de incubación.



**12)** Incubar a 37 °C durante 18-24 horas.





## LECTURA E INTERPRETACIÓN

**13)** Tras la incubación se anotan los resultados inmediatos, es decir, los que no requieren ser revelados. La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con las tablas de lectura que proporciona el proveedor, y anotando el resultado como positivo o negativo. (ANEXO II)



**13)** Determinadas pruebas requieren ser reveladas, para el revelado se tienen que tener en cuenta dos criterios:

- Si la glucosa da negativo y los test positivos son dos o menos de dos, no hay que añadir reactivos.
- Si la glucosa es positiva y/o tres o más test son positivos se revelan los test que requieren reactivos:

**TDA:** añadir una gota de  $\text{FeCl}_3$  10% (una gota del reactivo TDA)

Positivo= color marrón oscuro





**VP:** añadir una gota del reactivo VP1 y una gota del reactivo VP2

Positivo= color rosa fuerte o rojo en 5-10 minutos.

Negativo= color rosa débil después de los 10 min.



**IND:** añadir una gota de reactivo de Kovacs<sup>1</sup> o dimetilamino-cinamaldehído <sup>2</sup>. O reactivo de James <sup>3</sup>. Dependiendo del reactivo utilizado pueden darse las posibilidades siguientes:

<sup>1</sup>Positivo= aparece un anillo rosa-rojo.

<sup>2</sup>Positivo= color de rosa a morado en todo el pocillo.

<sup>3</sup>Positivo= rosa



**vv**

**Oxidasa:** es la prueba número 21 y se realiza de forma independiente a la tira. Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

Positivo= color azul que aparece inmediatamente.



Reducción de los nitratos en nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y en nitrógeno ( $\text{N}_2$ ): añadir una gota de los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos.

Positivo ( $\text{NO}_2$ )= coloración roja



Negativo = coloración amarilla, puede deberse a la producción de nitrógeno (eventualmente señalado por la presencia de micro-burbujas): agregar de 2 a 3 mg de reactivo Zn en la cúpula GLU. Después de 5 minutos, si el color sigue siendo **amarillo**, indica una reacción **positiva** ( $\text{N}_2$ )

Negativo= coloración naranja-rojizo de la cúpula, ya que los nitratos aún presentes en el tubo han sido reducidos a nitritos por el Zinc.



**14)** Del conjunto de reacciones y resultados **se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa).**

Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 o 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

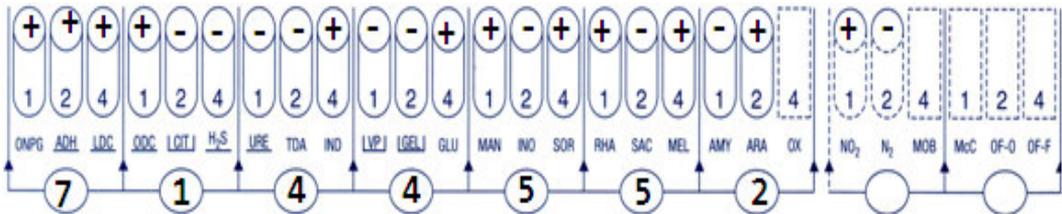
-  Si la reacción es negativa en un pocillo se pone 0.
-  Si la reacción es positiva en el 1º pocillo se escribe 1, si es positiva en el 2º pocillo se escribe 2 y si es positiva en el 3º se escribe 4, obteniendo un triplete.
-  Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata. <sup>(7,8,9)</sup>





**15)** Reportar los resultados de las pruebas que fueron reveladas con reactivos en el formato. (ANEXO II)

<p>ONPG ADH LDC</p>	<p>ODC CIT H2S</p>	<p>URE TDA IND</p>
<p>VP GEL GLU</p>	<p>MAN INO SOR</p>	<p>RHA SAC MEL</p>
<p>AMY ARA OX NO2 N2</p>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> <p><b>PERFIL NUMÉRICO DE 7 CIFRAS: 7144552</b></p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p><b>IDENTIFICACIÓN:</b></p> </div>	





## API 20C AUX

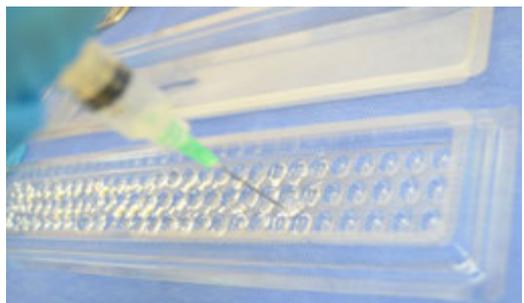
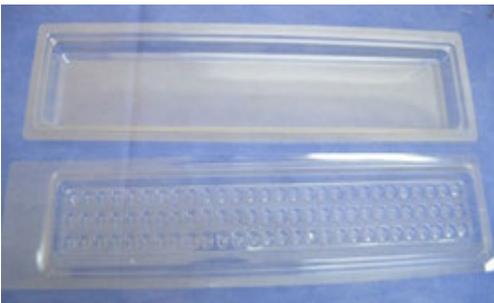
### METODOLOGÍA

MATERIAL	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Kit API 20C AUX</li><li>• Micropipeta de 100µl</li><li>• Solución fisiológica de NaCl al 0.85%</li><li>• Guantes</li><li>• Cubrebocas</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Patrón 2 de MacFarland</li><li>• Ampolla API C Médium</li></ul>



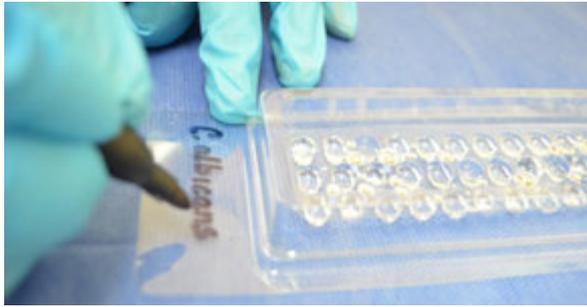
### PREPARACIÓN DE LA GALERÍA

- 1) Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada [o cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles de liberar gases (Ej.: Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, etc.)] en los alvéolos para crear una atmósfera húmeda.





- 2) Inscribir la referencia de la cepa en la lengüeta lateral de la cámara. (No inscribir la referencia sobre la tapa, ya que ésta puede resultar desplazada durante la manipulación).



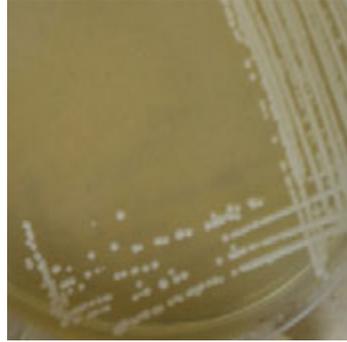
- 3) Retirar la galería de su envase individual y depositarla en la cámara de incubación.

#### **PREPARACIÓN DEL INÓCULO.**

- 4) Abrir una ampolla de API NaCl 0,85% Médium o una solución estéril que contenga la misma solución sin aditivos.

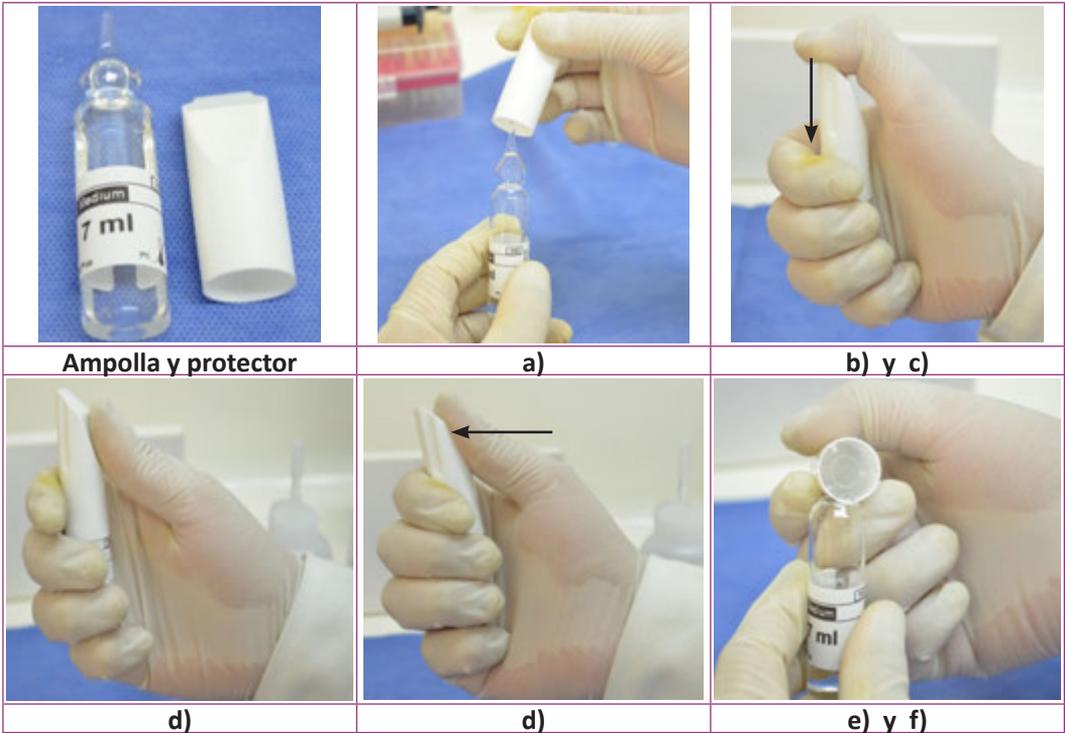


- 5) A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión de levaduras de turbidez igual a la del patrón 2 de McFarland. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.



**6)** Abrir una ampolla de API C Médium:

- a)** Introducir la ampolla en el protector de ampolla.
- b)** Sujetar verticalmente el conjunto en una mano (tapón blanco hacia arriba).
- c)** Presionar a fondo el tapón blanco.
- d)** Ejercer una presión horizontal con el pulgar en la parte estriada del tapón para romper la extremidad de la ampolla.
- e)** Sacar la ampolla del protector de ampolla y conservarla para un próximo uso.
- f)** Retirar delicadamente el tapón.



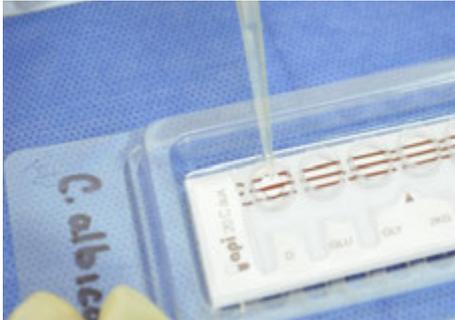
- 7)** Con la ayuda de la micropipeta, transferir 100 microlitros de la suspensión de levaduras a una ampolla de C Médium y homogeneizar con la micropipeta evitando la formación de burbujas.



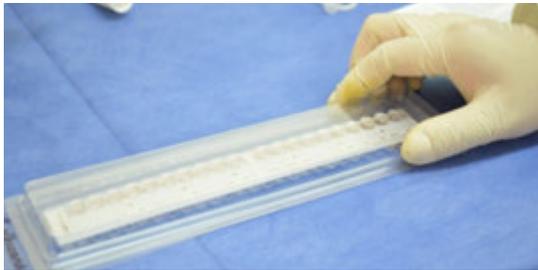


## INOCULACIÓN DE LA GALERÍA

- 8) Llenar las cúpulas con la suspensión obtenida en el API C Médium. Evitar la formación de burbujas apoyando la punta de la micropipeta sobre el borde de la cúpula. Cuidar que se cree un nivel horizontal o ligeramente convexo pero jamás cóncavo. Las cúpulas parcial o excesivamente llenas son causa de resultados incorrectos.



- 9) Volver a cerrar la cámara de incubación e incubar 48-72 horas ( $\pm 6$  horas) a  $29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



## LECTURA DE LA GALERÍA

Después de 48 horas de incubación, o de 72 horas (si los ensayos, no resultan muy claros después de 48 horas), observar el crecimiento de las levaduras comparativamente con la cúpula 0, testigo negativo. Una cúpula con mayor turbidez que la de control nos indica una reacción positiva que ha de ser anotada en la hoja de resultados.

Con el fin de evitar toda contaminación durante una reincubación, levantar la tapa exclusivamente durante el período de lectura.

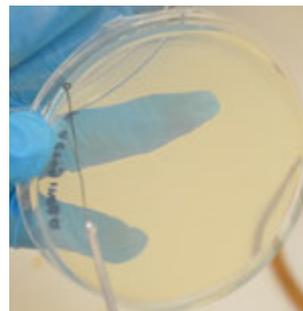


## SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

### EQUIPO Y REACTIVOS

MATERIAL	MEDIOS DE CULTIVO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bata</li> <li>• Asa bacteriológica</li> <li>• Multidiscos Gram positivos y Gram negativos</li> <li>• Guantes</li> <li>• Cubrebocas</li> <li>• Mechero</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Müeller Hinton</li> </ul>

- 1) En una placa de MH inocular en todo el medio el microorganismo identificado, a partir de una colonia perfectamente aislada.





- 2) Colocar los multidiscos sobre el agar sembrado con la cepa aislada e inocular la placa de 35 a 37 °C por 23 horas.



- 3) Realizar la lectura del antibiograma, utilizando la hoja para susceptibilidad a antibióticos suministrada por el proveedor. <sup>(11)</sup> (ANEXO III )



- 4) Anotar los resultados en el formato de resultados (ANEXO III). Se colocará el nombre del microorganismo patógeno identificado, así como la susceptibilidad a antibióticos en el formato de resultados: informe del laboratorio. (ANEXO IV)

## **V.I Fase Postanalítica**

Los resultados e interpretación se anotarán en el formato de Laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas (ANEXO IV). Se colocará el nombre del microorganismo(s) patógeno(s) identificado(s), así como la susceptibilidad a antibióticos en dicho formato.

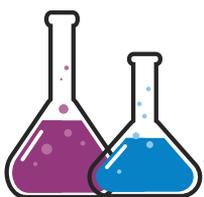


## **VI. Referencias**

1. Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. Bailey y Scott. Diagnóstico Microbiológico. 12º Edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009.
2. Spicer W. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. Texto y atlas en color. 2a ed. Barcelona: Elsevier; 2009
3. Organización mundial de la salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3º ed. Ginebra, 2005. [223 páginas]. Disponible en: [http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11SP.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf)
4. Lloret AC. Garantía de calidad en los laboratorios de microbiología clínica de la comunidad Valenciana: Manual de toma de muestras. Barcelona: Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat; 2004. Disponible en: <http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/documentos/V.3939-2004.pdf>
5. García del Valle A. Manual de Microbiología Médica. 2ª ed. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 2010.
6. Biomeriux. Medios cromogénicos chromID. 2021. Disponible en: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/linea-chromidr>
7. Winn W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop P., Schreckenberger P., Woods G. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas en color. 6 ed. Médica Panamericana: Buenos Aires; 2008.
8. bioMérieux. API® 20 E, Sistema de identificación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos no exigentes. bioMérieux; 2010. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
9. Prats G. Microbiología Clínica. Madrid; Médica Panamericana; 2006
10. bioMérieux. API® 20 Staph, Sistema de identificación de estafilococos, micrococos y géneros relacionados. bioMérieux; 2009. Recuperado de: <https://www.biomerieux.com.mx/diagnostico-clinico/productos/apir>
11. Biorad. Discos para comprobar la susceptibilidad a los antibióticos. Biorad 2010; [7 páginas]. Disponible en: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/>



12. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. [internet] México: DOF, 2003 [consultado 2022 enero 21]. Disponible en: Norma Oficial Mexicana Nom-087-Ecol-1995 (jalisco.gob.mx).



## Anexos

---



## ANEXO I. Formato de resultados método tradicional

### TINCIÓN DE GRAM

CLAVE CEPA	FORMA INDIVIDUAL	AGRUPACIÓN	TIPO DE GRAM
1			
2			
3			
4			
5			
6			

### MORFOLOGÍA COLONIAL

CLAVE CEPA	1	2	3	4
MEDIO DE CULTIVO				
TAMAÑO				
FORMA				
BORDE				
COLOR				
SUPERFICIE				
ELEVACIÓN				
LUZ REFLEJADA				
LUZ TRANSMITIDA				
CONSISTENCIA				
OTRAS <sup>1</sup>				

<sup>1</sup> Características que dependen del medio de cultivo: hemólisis, acidificación del medio, reducción de sales, entre otras.



## TINCIONES ESPECIALES

CLAVE CEPA			
NOMBRE TINCIÓN			
ESTRUCTURA DEL MICROORGANISMO			
PRESENCIA Y ABUNDANCIA			

## PRUEBAS BIOQUÍMICAS

CARACTERÍSTICA	Clave de la sepa						CARACTERÍSTICA	Clave de la sepa					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
Ácido de: ADONITOL							MOVILIDAD						
ARABINOSA							PRODUCCIÓN DE: H <sub>2</sub> S						
GLUCOSA							INDOL						
INOSITOL							UREASA						
INULINA							FENILALANINA DESAMINASA						
LACTOSA							DESAMINACIÓN DE: LISINA						
MALTOSA							DESCARBOXILACIÓN DE: LISINA						
MANITOL							ORNITINA						
SACAROSA							CITRATO COMO FUENTE DE C						
SALICINA							REDUC. DE NO <sub>3</sub> A NO <sub>2</sub>						
SORBITOL							DE NO <sub>2</sub> A N <sub>2</sub>						
TREHALOSA							LECHE TORNASOL <sup>3</sup>						
O/F GLUCOSA <sup>2</sup>							O/F MANITOL <sup>2</sup>						
RM / VP							O/F MALTOSA <sup>2</sup>						
TSI (SUP/FONDO)							RED. DEL AZUL DE METILENO.						

<sup>2</sup> O = Oxidativo

F = Fermentativo

N = No utiliza el carbohidrato

<sup>3</sup> A = Ácido

C = Coágulo

F = Fermentativo

G = Gas

P = Peptonización

K = Alcalino

R = Reducción



## PRUEBAS ESPECIALES

PRUEBA	CLAVE DE LA SEPA						PRUEBA	CLAVE DE LA SEPA						
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6	
PROD. DE: CATALASA							CAMP							
COAGULASA							SOLUBILIDAD EN BILIS							
OXIDASA							CRECIMIENTO: 4 °C							
SENS. A: BACITRACINA							42 °C							
KANAMICINA							PH = 6							
OPTOQUINA							PH = 9							
PROD. DE: PIOCIANINA							NACL 7.5 %							
FLUORESCÉINA							TELURITO 0.2 %							
REDUCCIÓN DE TELURITO														



## ANEXO II. Formato de resultados método alternativo

### API® 20 Staph

Cepa	O	G	F	M	M	L	T	M	X	M	N	P	V	R	X	S	M	N	A	U	Identificación		
		L	R	N	A	A	R	A	L	E	I	A	P	A	Y	A	D	A	D	H	E		
		U	U	E	L	C	E	N	T	L	T	L		F	L	C	G	G					
1																							
2																							
3																							
4																							
5																							

### API® 20 E

Cepa	O	A	L	O	C	H	U	T	I	V	G	G	M	I	S	R	S	M	A	A	N	N	Identificación	
	N	D	D	D	I	S	R	D	N	P	E	L	A	N	O	H	A	E	M	R	O			
	P	H	C	C	T		E	A	D		L	U	N	O	R	A	C	L	Y	A				
	G																							
1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

### API® 20 NH

Cepa	P	G	F	M	S	O	U	L	P	β	P	G	I	Identificación
	E	L	R	A	A	D	R	I	A	G	r	G	N	
	N	U	U	L	C	C	E	P	L	A	o	T	D	
									L	A	A			
1														
2														
3														
4														
5														



### API® 20 Coryne

Cepa	N I T	P Y Z	P y r A	P A L	β G U R	β G A L	α G L U	β N A G	E S C	U R E	G E L	0	G L U	R I B	X Y L	M A N	M A L	L A C	S A C	G L Y G	Identificación	
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						

### MEDIO CROMOGENICO

MORFOLOGÍA COLONIAL				
CLAVE DE LA CEPAS				
<b>MEDIO CROMOGENICO</b>				
TAMAÑO				
FORMA				
BORDE				
COLOR				
SUPERFICIE				
LUZ REFLEJADA				
LUZ TRANSMITIDA				
CRECIMIENTO				
OTRAS <sup>1</sup>				

<sup>1</sup> Características que dependen del medio de cultivo.



## \* TABLA DE IDENTIFICACIÓN API® 20

### API® 20 Staph

TEST	COMPONENTES ACTIVOS	CANT (mg/cúp)	REACCIONES/ ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
<b>0</b>	Sin sustrato		Testigo negativo	Incoloro	Rosa/Rojizo
<b>GLU</b>	D-glucosa	1,56	(Testigo positivo) ( D- glucosa)	Rojo *	Amarillo
<b>FRU</b>	D-fructuosa	1,4	Acidificación (D-FRuctuosa)		
<b>MNE</b>	D-manosa	1,4	Acidificación (D-MANosa)		
<b>MAL</b>	D-maltosa	1,4	Acidificación (MALtosa)		
<b>LAC</b>	D-lactosa (origen bovino)	1,4	Acidificación (LACTosa)		
<b>TRE</b>	D-trehalosa	1,32	Acidificación (D-TREhalosa)		
<b>MAN</b>	D-manitol	1,36	Acidificación (D-MANitol)		
<b>XLT</b>	Xilitol	1,4	Acidificación (XiLiTol)		
<b>MEL</b>	D-melibiosa	1,32	Acidificación (D-MELibiosa)		
<b>NIT</b>	Nitrato de potasio	0,08	Reducción de NITratos a nitritos		
				Incoloro – Rosa claro	Rojo
<b>PAL</b>	$\beta$ -nafti fosfato	0,0244	Fosfatasa ALcalina	ZYM A + ZYM B / 10 min	
				Amarillo	Violeta



VP	Piruvato de sodio	1,904	Producción de acetil-metil-carbinol (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min	
				Incoloro-Rosa claro	Violeta-Rosáceo
RAF	D-rafinosa	1,56	Acidificación (RAFinosa)	Rojo	Amarillo
XYL	D-xilosa	1,4	Acidificación (XYLosa)		
SAC	D-sacarosa (sucrosa)	1,32	Acidificación (SACarosa)		
MDG	Metil- $\alpha$ D-glucopiranosida	1,28	Acidificación (Metil- $\alpha$ D-Glucopiranosida)		
NAG	N-acetil-glucosamina	1,28	Acidificación (N-Acetil-Glucosamina)		
<u>ADH</u>	L-arginina	1,904	Arginina DiHidrolasa	Amarillo	Naranja-Rojo
<u>URE</u>	Urea	0,76	UREasa	Amarillo	Rojo-Violeta

Los ensayos de acidificación deberían compararse con los testigos negativo (0) y positivo (GLU).

\* Cuando MNE y XLT van precedidos o seguidos por ensayos positivos, la prueba naranja debería considerarse negativa.<sup>20</sup>



## API® 20 E

TEST	COMPONENTES ACTIVOS	CANT (mg/ cúp)	REACCIONES/ ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	2-nitro-fenil-β D-galactopiranosida	0,223	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD- galactoprianosidasa)	Incoloro	Amarillo (1)
<u>ADH</u>	L-arginina	1,9	Arginina-dihidrolasa	Amarillo	Rojo/ Anaranjado (2)
<u>LDC</u>	L-lisina	1,9	Lisina Descarboxilasa	Amarillo	Rojo/ Anaranjado (2)
<u>ODC</u>	L-ornitina	1,9	Ornitina Descarboxilasa	Amarillo	Rojo/ Anaranjado (2)
<u>CIT</u>	Citrato trisódico	0,756	Utilización del CITrato	Verde pálido/ Amarillo	Azul-verde/ Azul (3)
<u>H<sub>2</sub>S</u>	Tiosulfato sódico	0,075	Producción de H <sub>2</sub> S	Incoloro/ Grisáceo	Deposito negro/fin liserado
<u>URE</u>	Urea	0,76	UREasa	Amarillo	Rojo/ Anaranjado (2)
TDA	L-triptófano	0,38	Triptófano DesAminasa	TDA / inmediato	
				Amarillo	Marrón-rojizo
IND	L-triptófano	0,19	Producción de INDole	JAMES / Inmediato	
				Incoloro Verde pálido/ Amarillo	Rosa
<u>VP</u>	Piruvato sódica	1,9	Producción de acetoína (Voges Proskauer)	VP1 +VP2 /10 min	
				Incoloro / Rosa pálido	Rosa / Rojo (5)
<u>GEL</u>	Gelatina (origen bovino)	0,6	Gelatinasa (GELatina)	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1,9	Fermentación / oxidación (GLUcosa) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo / Amarillo grisáceo



TEST	COMPONENTES ACTIVOS	CANT (mg/ cúp)	REACCIONES/ ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
MAN	D-manitol	1,9	Fermentación / oxidación (MANitol) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo
INO	Inositol	1,9	Fermentación / oxidación (INOsitol) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo
SOR	D-sorbitol	1,9	Fermentación / oxidación (SORbitol) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo
RHA	L-ramnosa	1,9	Fermentación / oxidación (RHAmnosa) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo
SAC	D-sacarosa	1,9	Fermentación / oxidación (SACarosa) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo
MEL	D-melibiosa	1,9	Fermentación / oxidación (MELibiosa) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo
AMY	Amigdalina	0,57	Fermentación / oxidación (AMYgdalina) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo
ARA	L-arabinosa	1,9	Fermentación / oxidación (ARABinosa) (4)	Azul / Azul verdoso	Amarillo

- (1) Un color amarillo muy ligero también implica resultado positivo.
- (2) La aparición de un color naranja tras 36-48 hrs de incubación debe considerarse negativa.
- (3) Lectura en la cúpula (zona aerobia).
- (4) La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.
- (5) Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 minutos, debe ser leída como negativa. <sup>(22)</sup>

API® 20 NH <sup>23</sup>

TEST	COMPONENTES ACTIVOS	CANT (mg/cúp)	REACCIONES/ ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
<u>PEN</u>	Penicilina G	1,36	PENicilinas	Azul (ausencia de penicilinas)	Amarillo / Amarillo verdoso / Amarillo azuloso (presencia de penicilinas)
<u>GLU</u>	Glucosa	0,5	GLUcosa (Acidificación)	Rojo / Rojo naranja	Amarillo / Naranja
<u>FRU</u>	Fructuosa	0,1	FRUctuosa (Acidificación)		
<u>MAL</u>	Maltosa	0,1	MALtosa (Acidificación)		
<u>SAC</u>	Sacarosa	0,5	SACarosa (Acidificación)		
<u>ODC</u>	Ornitina	0,55	Ornitina Descarboxilasa	Amarillo verdoso / Gris verdoso	Azul
<u>URE</u>	Urea	0,41	UREasa	Amarillo	Rosa violeta
<u>LIP</u>	5-bromo-3- indoxyl-caprato	0,033	LIPasa	Incoloro / Gris pálido	Azul (+ precipitado)
<u>PAL</u>	Para-Nitrofenil- fosfato 2CHA	0,038	Fosfatasa Alcalina	Incoloro / Amarillo pálido	Amarillo
<u>βGAL</u>	Para-Nitrofenil-BD galactopiranosida	0,04	β GALactosidasa	Incoloro	Amarillo
<u>ProA</u>	Prolina-4-metoxi-β naftilamida	0,056	Prolina Arimidasa (Si LIP es +, ProA siempre es -)	ZYM B / 3 min	
				Amarillo / Naranja pálido (Marrón si LIP es +)	Naranja
<u>GGT</u>	Gama glutamil 4-metoxi-β naftilamida	0,049	Gama glutamil transferasa	ZYM B / 3 min	
				Amarillo / Naranja pálido (Amarillo naranja si PAL es +)	Naranja
<u>IND</u>	Triptófano	0,036	Indol	JAMES / 3 min	
				Incoloro	Rosa



API 20® Coryne <sup>24</sup>

TEST	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
		NEGATIVO	POSITIVO
NIT	Reducción de NITrato	NIT A + NIT B / 10 min	
		Incoloro / Rosa muy pálido	Rosa oscuro / Rojo
PYZ	PYraZinamidasa	PYZ / 10 min	
		Incoloro / Café muy pálido / Anaranjado muy pálido	Café / Anaranjado
PyrA	PIRolidonil Arilamidasa	ZYM A + ZYM B / 10 min	
		Incoloro / Anaranjado pálido	Anaranjado
PAL	Fosfatasa alcalina	Incoloro / Purpura pálido / Anaranjado pálido	Purpura
βGUR	β-GIUcuRonidasa	Incoloro / Gris pálido / Beige pálido	Azul
βGAL	β-GALactosidasa	Incoloro / Purpura pálido	Purpura
αGLU	A-GLUcosidasa	Incoloro / Purpura pálido / Verde pálido	Purpura
βNAG	N-Acetyl-β-Glucosamina	Incoloro / Purpura pálido / Café pálido / Gris pálido	Café
ESC	Hidrólisis β-glucosidasa (ESculina)	Incoloro / Gris	Negro
<u>URE</u>	UREasa	Amarillo / Anaranjado	Rojo / Rosa
<u>GEL</u>	Hidrólisis de la GELatina	No difusión	Difusión de pigmento negro
<u>O</u>	Testigo negativo	Rojo / Anaranjado	Amarillo / Amarillo naranja
<u>GLU</u>	Fermentación GLUcosa		
<u>RIB</u>	Fermentación RIBosa		
<u>XYL</u>	Fermentación XYLosa		
<u>MAN</u>	Fermentación MANitol		
<u>MAL</u>	Fermentación MALtosa		
<u>LAC</u>	Fermentación LACTosa		
<u>SAC</u>	Fermentación SACarosa		
<u>GLYG</u>	Fermentación GLYcoGeno		



## ANEXO III. Sensibilidad a antibióticos

Clave de la cepa _____		R, I, S
AMIKACINA	AK	
AMPICILINA	AM	
CARBENICILINA	CB	
CEFALOTINA	CF	
CEFOTAXIMA	CTX	
CEFTAZIDIMA	CAZ	
CEFTRIAXONA	CRO	
CEFUROXIMA	CXM	
CLORANFENICOL	CL	
DICLOXACILINA	DC	
ENOXACINA	ENX	
ERITROMICINA	E	
GENTAMICINA	GE	
NETILMICINA	NET	
NITROFURANTOÍNA	NF	
PENICILINA	PE	
PEFLOXACINA	PEF	
TETRACICLINA	TE	
TRIMETOPRIM- SULFAMETOXAZOL	SXT	
R = Resistente      I = Intermedio      S = Sensible		



## DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN EN mm

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN	R ( < o = )	I	S ( > o = )
AMIKACINA	30 µg	14	15-16	17
AMPICILINA	10 µg			
ENTEROBACTERIACEAE		11	12-13	14
<i>Staphylococcus spp.</i>		28		29
ENTEROCOCOS		16		
OTROS ESTREPTOCOCOS		21		30
CARBENICILINA	100 µg			
ENTEROBACTERIACEAE		17	18-22	23
<i>Pseudomonas spp.</i>		13	14-16	17
CEFALOTINA	30 µg	14	15-17	18
CEFOTAXIMA	30 µg	14		23
CEFTAZIDIMA	30 µg	14	15-17	18
CEFTRIAXONA	30 µg	13		21
CEFUROXIMA	30 µg	14	15-17	18
CLOXANFENICOL	30 µg	12	13-17	18
DICLOXACILINA	1 µg			
<i>Staphylococcus spp.</i>		10	11-12	13
PENICILINA VS NEUMOCOCOS		19		20
ENOXACINA	10 µg	14	15-17	18
ERITROMICINA	15 µg	13	14-17	18
GENTAMICINA	10 µg	12	13-14	15
NETILMICINA	30 µg	12	13-14	15
NITROFURANTOÍNA	300 µg	14	15-16	17
PEFLOXACINA	5 µg	14	15-22	23
PENICILINA	10 U			
<i>Staphylococcus spp.</i>		28		29
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		19		20
ENTEROCOCOS		14		
OTROS ESTREPTOCOCOS		19		28
TETRACICLINA	30 µg	14	15-18	19
TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL	25 µg	10	11-15	16
R = Resistente		I = Intermedio		S = Sensible



## PRUEBA DE SENSIBILIDAD (ANTIBIOGRAMA). MÉTODO DE KIRBY BAUER.

Después de cultivar un microorganismo patógeno, las pruebas de sensibilidad a antibióticos específicos orientan al especialista en cuanto a la elección del tratamiento antimicrobiano. Algunos microbios, como *Streptococcus pyogenes* y *N. meningitidis*, presentan patrones de sensibilidad predecibles frente a ciertos antibióticos. En cambio, los patrones de sensibilidad antibiótica de la mayoría de los bacilos gramnegativos, los enterococos y las especies estafilocócicas suelen ser impredecibles; por lo tanto, es preciso recurrir al cultivo y antibiograma para seleccionar los fármacos adecuados.

La herramienta cualitativa clásica para las pruebas de sensibilidad es el método de difusión con discos de Kirby Bauer, en el que discos con cantidades exactas de distintas sustancias antimicrobianas se colocan en placas de cultivo inoculadas con el microorganismo de prueba. Posteriormente, las placas se mantienen bajo vigilancia para detectar el crecimiento del organismo (resistencia al fármaco) o su inhibición (sensibilidad al fármaco). La concentración del antibiótico en el disco y su velocidad de difusión influyen en el tamaño de la zona de inhibición de crecimiento. El método de difusión con discos es útil cuando es necesario establecer si un patógeno es sensible a un antibiótico poco frecuente, no disponible en sistemas automatizados. El procedimiento general se describe en la figura 1.

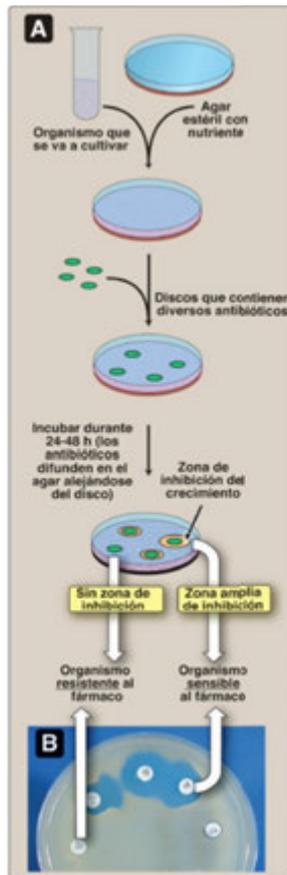
En esta técnica el microorganismo se inocula (“se siembra”) en la superficie de una placa de Petri (10 centímetros de diámetro) con agar Muller Hinton (con un espesor de 4 mm) de manera uniforme con una cantidad estandarizada del microorganismo de prueba (turbidez equivalente al 0.5 del nefelómetro de MacFarland). A continuación, se colocan sobre la superficie del agar solidificado discos de papel de filtro impregnados con concentraciones conocidas de los agentes antimicrobianos.

Durante la incubación los antimicrobianos se difunden por el agar desde los discos. Cuanto más lejos, del disco se difunde el agente menor es su concentración. Si el antimicrobiano es eficaz se forma un halo de inhibición alrededor del disco después de un período de incubación estandarizado. Se mide el diámetro de ese halo; en general, cuanto mayor es el diámetro más sensible es el microorganismo al antibiótico. El diámetro del halo se compara con una tabla de referencia para ese fármaco y esa concentración y se informa si el microorganismo es sensible, medianamente sensible o resistente al antimicrobiano. Sin embargo, en el caso de un fármaco con poca solubilidad el halo de inhibición que indica que el microorganismo es sensible será más pequeño que el del fármaco que es más soluble y se ha difundido más ampliamente. Esta prueba es simple y económica y es la utilizada con más frecuencia cuando no se dispone de instalaciones de laboratorio más sofisticadas. Las ventajas de este método son la distribución más pareja de los microorganismos y la apariencia más nítida y fácil de interpretar de las zonas de inhibición.



### Preparación de la solución estandarizada de MacFarland.

Con un hisopo estéril de poliéster tocar las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante, que han sido aisladas en un medio de aislamiento primario. Sumergir el hisopo en 3 ml de caldo soya tripteína, enjuagar bien en el líquido para descargar todo el material y luego retirar el hisopo. Colocar el tubo de cultivo en un baño de agua a 37 °C durante aproximadamente de 2 a 3 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland, esto equivale a una concentración aproximada de  $10^8$  microorganismos/ml. El estándar de 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de ácido sulfúico 0.36N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con el microorganismo en estudio, se puede efectuar mejor mirándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales.



**FIGURA 1.** A. Esquema del método de difusión con discos para determinar la sensibilidad de las bacterias frente a antibióticos. B. Placa de cultivo con discos impregnados de antibiótico.



## ANEXO IV. Formato de informe de laboratorio



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MÉDICA



FECHA: / /

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

FOLIO: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: (M) (F)

LOCALIDAD: \_\_\_\_\_

NOMBRE DEL MÉDICO SOLICITANTE: \_\_\_\_\_

ESTUDIOS REALIZADOS

VALORES DE REFERENCIA

OBSERVACIONES

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

SELLO DEL LABORATORIO

\_\_\_\_\_  
NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE



## **ANEXO V. Principio del método alternativo API 20 y medios cromogénicos**

### **API® 20**

Los sistemas miniaturizados API® 20 son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar.

Cada microtubo del sistema debe inocularse con una suspensión de un cultivo puro del microorganismo a ser identificado. En algunos casos estos microtubos deben llenarse completamente con la suspensión, mientras que en otros se requiere del añadido de parafina líquida estéril, que proporciona las condiciones anaeróbicas necesarias.

Todas las instrucciones para la preparación de la suspensión, así como para la inoculación de cada uno de los microtubos, y las condiciones de incubación se pueden encontrar claramente especificadas en los instructivos de uso señalados por el fabricante para cada tipo de galería.

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reacciona con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado.

La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. De acuerdo a esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-).

Después del periodo de incubación y comparar, con la carta de colores, los resultados obtenidos en cada microtubo se colocan en la hoja de resultados que suministra el fabricante.

Los datos así obtenidos pueden transformarse en un código de 7 dígitos denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla. En algunos sistemas miniaturizados se recomienda la realización de pruebas bioquímicas opcionales, que permiten obtener dos dígitos adicionales.



El código obtenido corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo a la información contenida en las bases de datos suministradas por el fabricante y que pueden encontrarse disponibles en forma impresa y/o electrónica.

La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático. <sup>(19)</sup>

## MEDIOS CROMOGÉNICOS

Medio selectivo – diferencial: En los medios selectivos siempre crecen algunas bacterias diferentes a la buscada, por ello para diferenciar las distintas colonias, se añade a los medios selectivos sustancias que confieren un color diferente a las colonias según la distinta actividad metabólica de las bacterias que las forman, convirtiéndolos en medios selectivos – diferenciales.

Para este propósito se utilizan azúcares como el manitol, la lactosa, el sorbitol y otros, junto con un indicador de pH (rojo neutro, azul de bromotimol, etc.).

En la actualidad los medios selectivos – diferenciales tienden a prepararse utilizando sustancias cromogénicas. <sup>(25)</sup>

Medio cromogénico: Los sustratos enzimáticos cromogénicos son compuestos que actúan como sustratos para enzimas específicas y cambian de color debido a la acción de la enzima sobre el sustrato. <sup>(4)</sup>

Dichas sustancias son productos químicos de síntesis que son incoloros cuando se unen a sustratos naturales por enlaces que son hidrolizados por enzimas microbianas específicas. Cuando la enzima microbiana hidroliza el enlace, se libera el compuesto cromogénico, que adquiere un color intenso. Así, por ejemplo, la galactosa se une a un colorante, el ortonitrofenol (ONF), por un enlace químico que es reconocido por una enzima bacteriana, la  $\beta$ -galactosidasa, cuya función natural es reconocer e hidrolizar el enlace entre la galactosa y la glucosa (que constituyen la lactosa). El complejo galactosa-ONF es incoloro, pero cuando es hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa y se libera el ONF, éste adquiere un intenso color amarillo. La aparición de ese color en la colonia y a su alrededor indica la presencia de la enzima. Algunas enzimas son específicas de un género, una especie o propias de un reducido número de especies, por lo que su detección permite su identificación. <sup>(25)</sup>



## ANEXO VI. Reporte de uroanálisis

Fecha				
Clave				
Edad / sexo				
Volumen (mL)				
Color				
Aspecto				
Densidad				
pH				
Leucocitos				
Nitritos				
Proteínas				
Glucosa				
Cetonas				
Urobilinógeno				
Bilirrubina				
Sangre / Hb				
<b>Examen microscópico</b>				
Cel. epiteliales				
Eritrocitos				
Leucocitos				
Bacterias				
Levaduras				
Cilindros				
Oxalato de calcio				
Fosfato amorfo				
Ácido Úrico				
Cristales colesterol				
Fosfato triple				
Otros				



## ANEXO VII. Determinación de *Candida albicans*

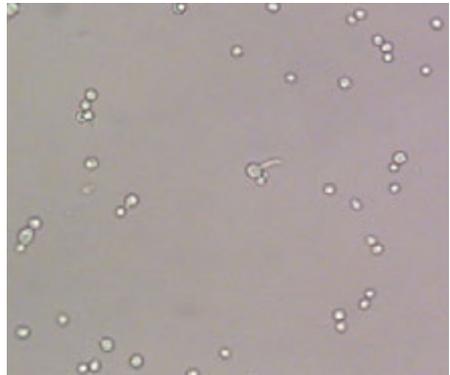
### 1. PRODUCCIÓN DE CLAMIDOSPORAS

- a) Divida por la mitad la caja de agar harina de maíz y en cada mitad siembre cada cepa en forma de “Z”.
- b) Incube a 37 °C por 24 a 48 horas.
- c) Tome una pequeña muestra de cada mitad en un portaobjetos y agregue una gota de solución salina.
- d) Observe al microscopio y reporte el tipo de desarrollo.



### 2. PRODUCCIÓN DE TUBO GERMINAL

- a) En dos tubos de ensaye coloque aproximadamente 1 ml de suero de conejo, carnero o humano.
- b) Inocule una asada de cada cepa de hongo.
- c) Incube a 35 °C durante 3 horas.
- d) Al término de la incubación, tome una gota de la solución de cada tubo, en su respectivo portaobjetos y se coloca un cubreobjetos.
- e) Observe al microscopio en busca del desarrollo del tubo germinal y reporte el resultado.





## ANEXO VIII. Elección del espéculo y su manejo.

### TAMAÑO DEL ESPÉCULO

De acuerdo a la complejión de la mujer y la cavidad se elige el tamaño del espéculo:

**Chico:** Se utiliza en mujeres delgadas, jóvenes que no han tenido hijos por parto vaginal o mujeres postmenopáusicas.

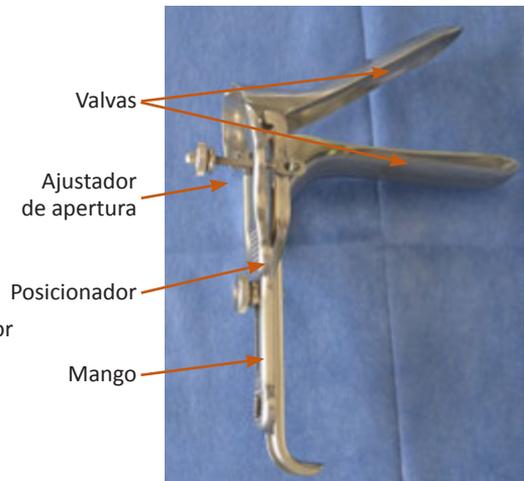
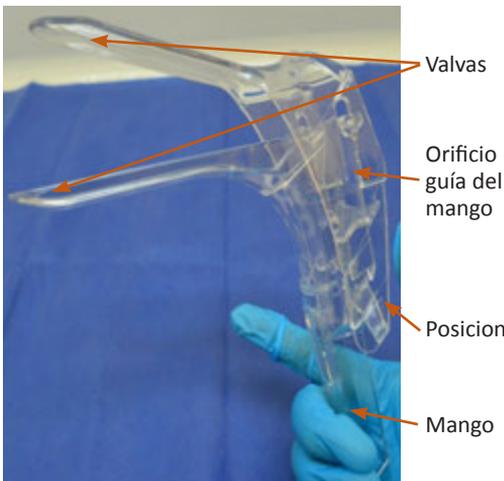
**Mediano:** se utiliza en mujeres de complejión mediana, un parto vaginal o por cesárea.

**Grande:** Se usa en mujeres de complejión muy grande o múltipara vaginal.

**NOTA:** verificar que el espéculo de plástico venga en su empaque bien cerrado para asegurar la esterilidad del producto, tenga fecha de caducidad y número de lote. Para el espéculo de metal, pedir a la persona que tomará la muestra, que muestre el empaque cerrado para asegurar la esterilidad del producto.



### PARTES DEL ESPÉCULO



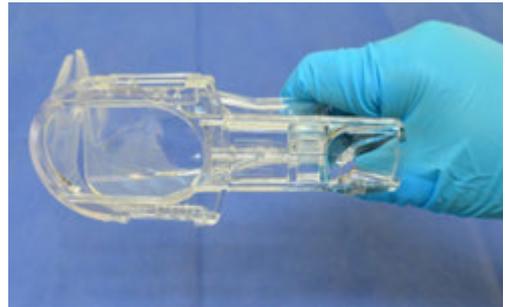


## MANEJO DEL ESPÉCULO DE PLÁSTICO

- 1) Sujete el espejo vaginal por el mando y observe que las valvas se encuentren juntas.



- 2) Para introducir el espejo vaginal, coloque el mango de manera horizontal.



- 3) Proceda a introducir el espejo hasta percibir una ligera resistencia. No abrir el espejo durante su introducción.

- 4) Una vez introducido, gire el mango con cuidado hasta que el mango quede en posición vertical y hacia abajo.





- 5) Coloque el dedo pulgar en el posicionador para separar las valvas y visualizar el cuello uterino.



- 6) Empuje el posicionador con el dedo pulgar hasta que la primera o segunda ceja se introduzca sobre el orificio guía del mango.

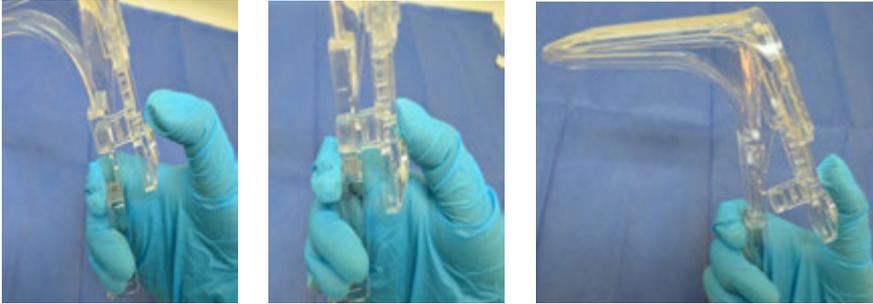


- 7) Deslice el posicionador sobre el orificio, empujando hacia arriba, delicadamente, hasta obtener la apertura deseada.

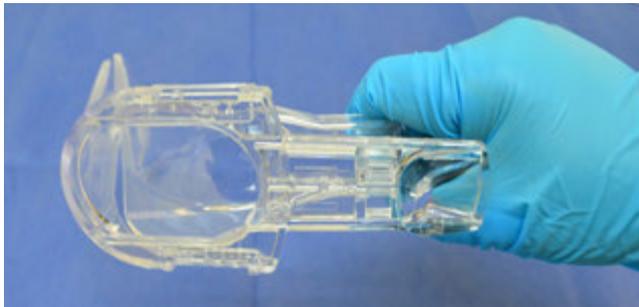




- 8) Efectúe el examen y/o toma de muestra.
- 9) Una vez finalizado el procedimiento, coloque el dedo pulgar por arriba del posicionador, deslizando en forma descendente, hasta que el espejo se cierre completamente, es decir, que las valvas vuelvan a estar juntas.



- 10) Para retirar el espejo, gire el mango a la posición horizontal y deslícelo hacia afuera.



- 11) Deseche el espejo vaginal, ya que solo se puede utilizar una vez.

**NOTA:** el manejo del espéculo de metal se describe en el apartado de Procedimiento de toma de muestra.



## ANEXO IX. Cuestionario de Evaluación de prácticas

1. ¿La redacción de las etapas de control de calidad dentro del manual son?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

2. ¿Qué te parece la estructura de la práctica?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

3. ¿Cómo consideras los apartados que conforman la práctica?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

4. ¿Cómo consideras los aspectos de bioseguridad contemplados en la práctica?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

5. ¿Cómo consideras las imágenes con respecto a la redacción de los procedimientos?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

6. ¿Cómo consideras las tablas de resultados del anexo?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

7. ¿Cómo consideras la redacción del procedimiento del método tradicional?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

8. ¿Cómo consideras la redacción del procedimiento del sistema API?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

9. ¿Cómo consideras la redacción del procedimiento del medio cromogénico?

Excelente ( )                      Bueno ( )                      Regular ( )                      Malo ( )

10. ¿Qué propondrías para mejorar el diseño de la práctica?

---

---

---



## ANEXO X. Rúbrica

### RÚBRICA PARA EVALUAR LA PRESENTACIÓN EN POWER POINT DE LA PRESENTACIONES PREVIAS A CADA PRÁCTICA

**Objetivo:** Evaluar la calidad de las presentaciones previas a cada una de las prácticas.

CRITERIO	EXCELENTE	SATISFACTORIO	MEJORABLE	INSUFICIENTE	PROMEDIO
<b>Presentación</b>	Las diapositivas cuentan con una presentación indicando el tema, los objetivos del tema, datos del expositor y de la escuela. <b>5 puntos</b>	Las diapositivas cuentan con una presentación, pero le faltan algunos datos que hagan referencia al tema, al expositor o a la escuela. <b>3 puntos</b>	Las diapositivas no cuentan con una presentación o sólo se indica un dato de los solicitados <b>2 puntos</b>	Las diapositivas no cuentan con una presentación. <b>0 puntos</b>	
<b>Formato</b>	Cuentan con un formato atractivo y limpio que permite comprender el texto y su relación con los recursos multimedia en cualquier diapositiva. <b>5 puntos</b>	Cuentan con un adecuado y limpio formato que permite entender el texto y su relación con los recursos multimedia en cualquier diapositiva. <b>3 puntos</b>	Cuentan con un formato necesario que permite ver el texto, pero es confusa su relación con los recursos multimedia en las diapositivas <b>2 puntos</b>	El formato no es atractivo o estéticamente limpio, lo que impide ver o leer el texto y comprender su relación con los recursos multimedia en cualquier diapositiva. <b>0 puntos</b>	



CRITERIO	EXCELENTE	SATISFACTORIO	MEJORABLE	INSUFICIENTE	PROMEDIO
<b>Usos de recursos multimedia</b>	Las imágenes, animaciones, videos, gráficos o diagramas están insertados de manera adecuada, ordenada, llamativa y tienen relación con el texto o la información que se está presentando <b>5 puntos</b>	Las imágenes, animaciones, videos, gráficos o diagramas están insertados de manera adecuada y tienen alguna relación con el texto o la información que se está presentando. <b>3 puntos</b>	Las imágenes, animaciones, videos, gráficos o diagramas están insertados de manera inadecuada, que generan la perdida de atención a lo importante y tienen muy poca relación con el texto o la información que se está presentando. <b>2 puntos</b>	No existen imágenes, animaciones, videos, gráficos o diagramas en las diapositivas que ayuden a comprender el tema. <b>0 puntos</b>	
<b>Ortografía</b>	No existen errores ortográficos <b>5 puntos</b>	La ortografía es buena. Falta algún acento <b>3 puntos</b>	La ortografía es suficiente, pero existen dos faltas de ortografía. <b>2 puntos</b>	Existes más de dos faltas de ortografía <b>0 puntos</b>	
<b>Nivel lingüístico</b>	Es muy apropiado para explicar el tema <b>5 puntos</b>	La mayoría de las veces es apropiada para explicar el tema <b>3 puntos</b>	Algunas veces es apropiado para explicar el tema <b>2 puntos</b>	La mayoría de las veces es inapropiada para explicar el tema <b>0 puntos</b>	
<b>Conclusión</b>	Contiene una conclusión congruente con los objetivos tema <b>5 puntos</b>	Contiene una conclusión con poca relación con los objetivos del tema. <b>3 puntos</b>	Contiene conclusión sin relación con los objetivos del tema <b>2 puntos</b>	No tiene conclusión. <b>0 puntos</b>	
<b>Promedio</b>					



## ANEXO XI. Lista de cotejo

### LISTA DE COTEJO PARA EVALUAR LAS ACTIVIDADES DEL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA MÉDICAS

Grupo:	Semestre:
Equipo:	Fecha:

**Objetivo:** Evaluar las habilidades, destrezas, conocimientos y aptitudes de los alumnos adquiridas en el laboratorio de Bacteriología y Micología Médicas.

**Instrucciones:** Marcar con una "X" el cumplimiento o no de cada uno de los aspectos a evaluar.

Alumno	Acción a evaluar																				Observaciones	
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10			
	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no	si	no		
A																						
B																						
C																						
D																						
E																						

**MIEMBROS DEL EQUIPO:**

A:

B:

C:

D:

E:

A	B	C
D	E	

Fotografías de los alumnos

Nombre y firma de los profesores



**ACCIONES A EVALUAR EN LA LISTA DE COTEJO**

1.- Uso correcto de la bata, cubrebocas y guantes.
2.- Realiza la limpieza de su área antes y después del trabajo en el laboratorio.
3.- Realiza su trabajo en el laboratorio con las medidas de seguridad adecuadas y con la normatividad aplicable.
4.- Utiliza de manera óptima el equipo de laboratorio (Microscopio autoclave, refrigerador, entre otros).
5.- Etiqueta adecuadamente su material (cajas de Petri, tubos, portaobjetos, colorantes, entre otros)
6.- Utiliza de manera óptima los medios de cultivo, pruebas bioquímicas y colorantes en el laboratorio.
7.- Realiza el aislamiento e identificación de microorganismos en el laboratorio.
8.- Elabora de manera limpia y ordenada los informes de laboratorio, así como la entrega de los mismos en el tiempo programado para ello
9.- Demuestra trabajo cooperativo y colaborativo con los compañeros de su equipo.
10.- Demuestra iniciativa para el trabajo en el laboratorio.

# Tomas de muestras básicas para el módulo de Bacteriología y Micología Médicas: un enfoque ilustrado

Dr. Roberto Cruz González Meléndez

Autor y Coordinador General

Q.F.B. Manuel Orduña Sánchez • Q.F.B. Georgina Guadalupe Bermejo Torres

Q.F.B. Rosalba Cervantes Cruz • Q.F.B. Ana Laura Loreto Pérez • Q.F.B. Angélica Ramon Olivera

Q.F.B. Antonio Avilés Villada • Q.F.B. Steffhany Liliana Ortega Cortés

Autores

El enfoque de este libro es por anatomía humana, en donde se consideran las tomas de muestra básicas por órganos y sistemas del cuerpo humano de manera gráfica y con descripción detallada de cada procedimiento. Lo anterior, con base en los contenidos del programa académico del módulo de Bacteriología y Micología Médicas. Se incorporan como parte importante del diagnóstico microbiológico, los medios cromogénicos, pruebas API 20, simuladores ginecológico y simulador masculino para las tomas de muestra de exudado vaginal y uretral respectivamente, con la finalidad de dar a conocer a los alumnos algunos de los avances científicos y tecnológicos en microbiología, logrando con ello preparar mejor a los alumnos que cursan este módulo y proporcionar los conocimientos necesarios para su formación y desarrollo de su futura profesión.



Facultad de Estudios Superiores Zaragoza,  
Campus I. Av. Guelatao No. 66 Col. Ejército de Oriente,  
Campus II. Batalla 5 de Mayo s/n Esq. Fuerte de Loreto,  
Col. Ejército de Oriente.  
Iztapalapa, C.P. 09230 Ciudad de México.  
Campus III. Ex fábrica de San Manuel s/n,  
Col. San Manuel entre Corregidora y Camino a Zautla,  
San Miguel Contla, Santa Cruz Tlaxcala.

<http://www.zaragoza.unam.mx>

