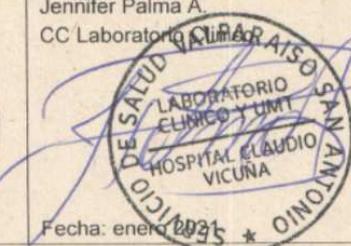
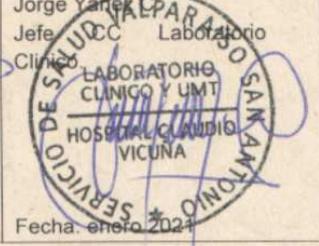


	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 1 de 118
		Fecha: enero 2021

“Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología”

Modificado: Jorge Ortiz P. Encargado de Calidad CC Laboratorio Clínico	Revisado por: Jennifer Palma A. CC Laboratorio Clínico	Aprobado por: Jorge Yáñez Jefe CC Laboratorio Clínico
		
Fecha: enero 2021	Fecha: enero 2021	Fecha: enero 2021

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 2 de 118
		Fecha: enero 2021

Índice

Ítem	Contenidos	Página
1.	Objetivos	5
2.	Alcance	5
3.	Documentos relacionados	5
4.	Responsables de la Ejecución	5
5.	Definiciones	5
6.	Desarrollo	6
6.1	Técnicas de ejecución de exámenes	7
6.1.1	Siembra de Cultivos Aerobios	7
6.1.2	Procesamiento y selección de medios de cultivo	10
6.1.3	Responsabilidades	11
6.1.4	Métodos de identificación	11
6.1.5	Procedimiento de tinción de Gram	11
6.1.6	Procedimiento técnico de métodos convencionales y rápidos de identificación de bacterias aerobias	12
6.1.7	Estudio de susceptibilidad antimicrobiana	17
6.1.8	Antibiograma por difusión en Agar (Técnica de Kirby-Bauer)	17
6.1.9	Antibiograma por difusión en Agar (E-TEST)	19
6.1.10	Método Automatizado	20
6.1.11	Procedimiento de urocultivo	30
6.1.12	Muestras de Orina según su origen	31
6.1.13	Sedimento Urinario Automatizado	31
6.1.14	Procedimiento de coprocultivo	33
6.1.15	Interpretación de las colonias y baterías	34
6.1.16	Procedimiento de hemocultivos	39
6.1.17	Procedimientos de muestras de catéter venoso central (CVC) técnica de Maki	41
6.1.18	Procedimiento de muestras de secreciones	41
6.1.19	Procedimiento de muestra de líquidos	41
6.1.20	Procedimiento de muestras de tejidos biológicos	44
6.1.21	Procedimientos para la búsqueda de patógenos específicos	45
6.1.22	Búsqueda de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	45
6.1.23	Búsqueda de <i>Streptococcus</i> del grupo B	45
6.1.24	Procedimiento en la vigilancia de enterococos resistentes a vancomicina y vigilancia de carbapenemasas	46
6.1.25	Procedimiento técnico para detección de <i>Helicobacter pylori</i>	46
6.1.26	Procedimiento técnico para detección de toxina A/B de <i>Clostridium difficile</i>	46
6.1.27	Procedimiento técnico para detección de <i>Ureaplasma urealyticum</i> y <i>Mycoplasma hominis</i>	47

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 3 de 118
		Fecha: enero 2021

6.1.28	Procedimiento técnico para detección de <i>Chlamydia trachomatis</i>	47
6.1.29	Procedimiento para test rápido de Influenza A/B y VRS	47
6.1.30	Procedimiento técnico para detección de antistreptolisina o ASLO	49
6.1.31	Procedimiento técnico en el diagnóstico serológico de sífilis	49
6.1.32	Prueba cualitativa RPR (Screening)	50
6.1.33	Procedimiento técnico de VDRL en lámina para muestras de sangre	58
6.1.34	Reacción cualitativa de VDRL en lámina con suero	60
6.1.35	Reacción cuantitativa de VDRL en lámina con suero	61
6.1.36	Examen de Microaglutinación para anticuerpos contra <i>Treponema pallidum</i> (MHA-TP)	63
6.1.37	Procedimiento técnico para estudio de bacilo de Koch	65
6.1.38	Consideraciones Generales	65
6.1.39	Preparación de los extendidos y tinción de Baciloscopías	66
6.1.40	Preparación de los extendidos (Una vez encendido el gabinete y el extractor de aire funcionando)	66
6.1.41	Tinción de los extendidos: Tinción de Ziehl Neelsen	68
6.1.42	Tinción de Auramina	68
6.1.43	Lectura de Baciloscopías	69
6.1.44	Procedimiento para la Técnica de Cultivo del Bacilo de Koch	70
6.1.45	Siembra cultivos sólidos	71
6.1.46	Siembra cultivo líquido	71
6.1.47	Informe semicuantitativo	72
6.1.48	PCR XPERT MTB/RIF Ultra	73
6.2	Protocolo de control de calidad y requisitos de calidad	74
6.2.1	Selección de material control	74
6.3	Procedimiento para control de calidad para mediciones cualitativas asociadas al laboratorio de bacteriología	75
6.3.1	Control de calidad de Antibiograma	76
6.3.2	Control de calidad de los medios de cultivo:	
6.3.3	Control de calidad de pruebas bioquímicas:	79
6.3.4	Control de calidad tinciones	81
6.3.5	Control de calidad de esterilidad en la preparación de medios de cultivo:	81
6.3.6	Control de equipos de mantención e incubación	81
6.3.7	Control de Kits Reactivos	81
6.4	Control de calidad para mediciones cualitativas asociadas al laboratorio de sífilis	81
6.4.1	Control de calidad RPR	82
6.4.2	Control de calidad de VDRL	83
6.4.3	Control de calidad de MHA-TP	86
6.5	Control de calidad interno de micobacterias	85
6.5.1	Control de Calidad de Baciloscopías	85
6.5.2	Control de Calidad Cultivos	86

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 4 de 118
		Fecha: enero 2021

6.6	Preparación de reactivos, baterías bioquímicas y medios de cultivos	88
6.6.1	Procedimiento para preparación de reactivos	87
6.6.2	Procedimiento para preparación de baterías	89
6.6.3	Procedimiento para preparación de medios de cultivo	91
6.7	Tiempos de respuesta en el laboratorio de microbiología	96
6.8	Procedimientos de Informe de Resultados	98
6.9	Eliminación de Muestras	98
6.10	Derivación de Cepas al ISP	98
7	Criterios de calidad	100
8	Flujograma	100
9	Distribución	100
10	Anexos	100
11.	Formulario de Control de Cambios	118

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 5 de 118
		Fecha: enero 2021

1. **Objetivos:**

Establecer, estandarizar y controlar la metodología de ejecución de exámenes de las muestras a analizar, hasta la entrega del informe de resultados, en la Unidad de Microbiología.

2. **Alcance:**

Este documento es aplicable para todos procesos de las etapas analítica y post-analítica de la sección de Microbiología, incluyendo las técnicas de ejecución de exámenes, los protocolos de control de calidad internos, los requisitos de calidad y los tiempos de respuesta.

Este documento debe ser conocido por todo el Personal Profesional, Técnico Paramédico y Administrativo del Laboratorio de Microbiología del Hospital Claudio Vicuña.

El trabajo diario será supervisado por el Tecnólogo Médico de la sección correspondiente.

3. **Documentos relacionados:**

- Documento normalizado ISP- CC 03/2009 “guía normalizada de control de calidad”

4. **Responsables de la Ejecución:**

De la Elaboración	Tecnólogos Médicos de Microbiología. Tecnólogo Médico Encargado de Calidad Tecnólogo Médico. Director Técnico de CC Laboratorio Clínico y UMT.
De la implementación	Tecnólogos Médicos de Microbiología y quienes realicen funciones en dicha sección Técnicos Paramédicos Secretarías
De la recepción de los Exámenes provenientes de Servicios Clínicos y APS	Técnicos Paramédicos que se desempeñe en la recepción de Laboratorio Clínico
De la Ejecución de los exámenes de Microbiología	Tecnólogos Médicos que se desempeñen en la sección de Microbiología
De la ejecución de los controles de Calidad de Microbiología	Tecnólogos Médicos que se desempeñen en la sección Microbiología
De la validación de los resultados	Tecnólogos Médicos que se desempeñen en la sección de Microbiología

5. **Definiciones**

- **Estándar de turbidez McFarland (McF):** se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para estimar el número de bacterias (UFC) por ml, en una escala que va de 0.5 a 5.0. Son creados al mezclar cloruro de bario y ácido sulfúrico en volúmenes específicos y pueden ser visualmente comparados con suspensiones de bacterias.
- **ITU:** Infección del tracto urinario
- **ATCC:** American type culture collection (cepas certificadas, material biológico de referencia)
- **BLEE:** Beta Lactamasa de espectro extendido.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 6 de 118
		Fecha: enero 2021

- **HALO:** zona de inhibición de desarrollo bacteriano, visible a ojo desnudo.
- **Inoculación:** siembra de una cepa bacteriana en un agar determinado.
- **BNF:** Bacilos No Fermentadores.
- **CLSI:** Clinical & Laboratory Standards Institute
- **VDRL:** Venereal disease research laboratory
- **RPR:** Rapid plasma reagin
- **MHA-TP:** Microhemaglutinación para Treponema pallidum
- **TBC:** Tuberculosis
- **BAAR:** Bacilo Acido Alcohol Resistente
- **EPSD:** Examen parasitológico seriado de deposiciones.
- **ENO:** Enfermedad de notificación obligatoria
- **LIS:** Sistema Informático de Laboratorio. Es el software que permite la integración y comunicación entre la unidad de Laboratorio Clínico, los servicios clínicos del hospital y los usuarios externos conectados.
- **Epicenter:** Es el software que permite tanto la integración de los diferentes resultados de la sección como la entrega de información de carácter estadístico de estos.
- **Material Control:** Elemento que tiene una o varias de sus propiedades establecidas para permitir su uso en una serie analítica cuantitativa que permite monitorear la exactitud y precisión de las mediciones
- **Validación analítica:** validación de resultados de exámenes, realizada después de la verificación, interpretación y análisis de los valores de analitos obtenidos por técnicas manuales o en los analizadores
- **Validación LIS:** validación de resultados de exámenes, realizada en el sistema informático de laboratorio

Abreviaturas:

- **HCV:** Hospital Claudio Vicuña.
- **CAE:** Consultorio de Atención de Especialidades.
- **CCI:** Control de Calidad interno.
- **APS:** Atención Primaria de Salud.
- **TM:** Tecnólogo Medico
- **TP:** Técnico Paramédico

6. Desarrollo

Técnica de ejecución de los exámenes.

Una vez terminada la toma de muestra y su etiquetado éstas son trasladadas en contenedores cerrados hasta la recepción de Laboratorio, donde el Técnico Paramédico de recepción (TP) es el encargado de recibir las muestras provenientes del CAE, de los diferentes servicios del hospital y de APS las 24 horas del día y durante toda la semana

Es en el área de la recepción donde se deben verificar las condiciones óptimas definidas en el Manual de Toma de Muestra de nuestro Laboratorio, luego de esto se coteja la orden

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 7 de 118
		Fecha: enero 2021

del examen con las muestras recibidas, se procede al ingreso de estas en el BiosLis y se verifica lo que está ingresado en este y lo solicitado en la orden por el Facultativo. Luego se procederá a su respectivo pistoleo de los códigos de barras para poder medir los tiempos de respuesta de nuestro Laboratorio.

Cualquier no conformidad con lo señalado, que genere un motivo de rechazo según el manual de toma de muestras, se avisará inmediatamente vía telefónica al servicio clínico correspondiente para el envío de una nueva muestra, registrándose en el LIS a quien se le avisa; en el caso de otras procedencias (usuarios externos) se rechaza la muestra vía LIS, el TM valida e imprime.

Cada muestra aceptada, ingresada al LIS y con su código de barras correspondiente, será entregada al Técnico Paramédico de cada sección quien volverá a revisar tanto la orden de solicitud, los exámenes solicitados y lo que fue ingresado al LIS. Luego de esto la muestra pasará al proceso de centrifugación y en donde se centrifugará de acuerdo al tipo de muestra en estudio y al tipo de examen, tal como se describe más adelante. Luego de esto será despachada al Tecnólogo Médico quien volverá a revisar lo antes mencionado en este párrafo.

En el área de procesamiento y al inicio de cada turno, el Tecnólogo Médico (TM) a cargo del analizador realiza preparación de los equipos: mantenimiento, revisión de reactivos, insumos, desechos y control de calidad.

Además de lo anterior, mantener durante todo el proceso las precauciones estándar para manejo de muestras biológicas, usar técnica aséptica y realizar procedimientos con mechero encendido, 5 centímetros proporciona un área libre de contaminación.

Mantener un área de trabajo despejada y cómoda para realizar los procesos, reuniendo previamente todos los materiales necesarios para la siembra. Esterilizar las asas en mechero antes y después de usarlas, enfriar antes de tomar la muestra y marcar placas y portaobjetos con el número de petición antes de comenzar la siembra.

6.1. Técnicas de Bacteriología

Es importante el trabajo en la sección de Bacteriología, dado a que consiste en una serie de etapas y está a su vez de procedimientos en cadena, que contribuyen tanto a la correcta identificación de los agentes patológicos como a su susceptibilidad a diferentes antimicrobianos. Las siguientes etapas se describen a continuación-

6.1.1 Siembra de Cultivos Aerobios

El Técnico paramédico (TP) de la sección de microbiología o urgencia (dependiendo del horario) es responsable de la recepción de la muestra, verificar el nombre del frasco o tórula con la orden de examen, la cual debe traer todos los datos necesarios para el correcto

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 8 de 118
		Fecha: enero 2021

análisis (diagnóstico clínico, método de recolección de la muestra, hora de obtención, administración de agentes antimicrobianos, nombre, RUT, edad, sexo, además de estar contenida en un frasco estéril, cerrado y sin signos de derrame.

Las muestras de orina recepcionadas para Urocultivo y para el análisis químico, llegan contenidas en un frasco único. Estas serán trasladadas en primera instancia a la sección de orinas en donde, a través de un sistema al vacío, se llenará un tubo estéril que será llevado por la TP de orinas a la sección de Microbiología para el cultivo.

Las solicitudes por agresión sexual deben venir junto a la cadena de custodia, la que debe ser completada por el TP que recibe.

La orden médica queda archivada en secretaría, mientras que desde el sistema se imprimirá la orden de trabajo a la que se le pegará una etiqueta autoadhesiva con código de barras, la cual tiene el nombre del paciente, RUT y procedencia. Ésta orden de trabajo etiquetada será trasladada a la sección junto con las muestras. Además se pegará una etiqueta en los libros de registros del laboratorio (un libro para urocultivos y otro libro para el resto de las muestras) donde también se asigna un número correlativo interno mensual a cada una de las muestras.

Cualquier no conformidad con lo señalado y que genere un motivo de rechazo según el manual de toma de muestras, se avisará inmediatamente vía telefónica al servicio clínico correspondiente para el envío de una nueva muestra y se debe registrar en LIS a quien se le avisa; en el caso de otras procedencias (usuarios externos) se procede al rechazo de la muestra vía LIS, se valida e imprime.

En caso de rechazo de muestras por agresión sexual, el TM debe llenar el formulario de cadena de custodia, dicho formulario se entrega junto con el informe de rechazo.

En esta etapa se debe:

1. Hacer correcto uso de los elementos de protección personal de la sección, el TP prende el mechero y vuelve a verificar el nombre del paciente con la orden de trabajo. Revisa los medios de cultivo que corresponde utilizar según el tipo de muestra.
2. Marca con el número correlativo mensual las placas, tubos y portaobjetos en caso de ser necesario.
3. La siembra dependerá del tipo de muestra y de cómo haya sido tomada, a saber, en tórula, líquidos, secreciones en recipientes estériles y trozos de tejidos. El principio general es siempre sembrar primero los medios sólidos, luego el líquido y por último realizar frotis para tinción. Para determinar la secuencia en que deben ser sembrados los medios de cultivo, siempre se debe empezar por el medio menos selectivo, para seguir con el medianamente selectivo y terminar con el más selectivo.

Los procedimientos de siembra según tipo de medio de cultivo son:

a) **Siembra en placa**

Se obtienen colonias aisladas por medio del arrastre y separación. Con el asa ya esterilizada, se toma la muestra, se deposita en un costado del agar de una placa Petri y

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 9 de 118
		Fecha: enero 2021

se estira a partir de este. En caso de muestras que vienen en tórula, se realiza con ésta el inóculo, procediendo después a diseminar con el asa (Figura 1).

En caso de muestras en las que se desea obtener el mayor desarrollo posible, la siembra se realiza con la tórula de muestra girándola a través de toda la placa

- **Esterilización simple:** utilizada principalmente para la mayoría de las muestras. Se inocula el primer cuadrante. Se esteriliza el asa y luego se disemina el 2° y 3° cuadrante. Si tiene varias placas, inocule primero el 1° cuadrante de todas las placas y luego disemine.
- **Esterilización doble:** se utiliza para muestras con mucho inóculo bacteriano como las deposiciones. La diferencia radica en agregar una segunda esterilización del asa entre el 2° y 3° cuadrante. Si tiene varias placas que sembrar, inocular el primer cuadrante de cada una y luego diseminar.

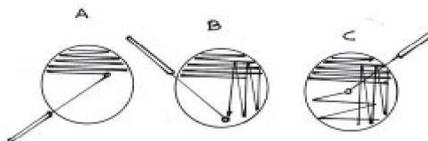


Figura 1: Siembra en placa

b) **Siembra de tubos de agar tendido**

El borde del tubo debe ser flameado antes y después de ser sembrado. Con el asa previamente esterilizada a la llama, se toma una pequeña cantidad de la muestra y se lleva al fondo del tubo, luego se estría suavemente la superficie del medio en forma ondulante. Ejemplo: agar Citrato de Simmons, Bilis/Esculina. (Figura a)

c) **Siembra en superficie y picadura**

El inóculo es introducido con el asa recta hasta el fondo del medio con un solo movimiento y teniendo cuidado de hacer el mismo trayecto al entrar y al salir, se retira hacia la superficie inclinada del agar haciendo suavemente una estría ondulada. Debe flamearse el borde del tubo antes y después de la siembra. Ejemplo: agar TSI, LIA.

d) **Siembra en profundidad**

El inóculo se introduce como una picadura en el medio del tubo cuidando que sea de manera recta y central hasta el fondo del tubo. Se debe hacer el mismo trayecto de entrada y salida. Ejemplo: agar MIO. (Figura b)

e) **Siembra del inóculo longitudinalmente y diseminación con estría única.**

Usado principalmente para orina y muestras respiratorias como lavado bronco alveolar. El inóculo se siembra en el centro haciendo una línea longitudinal y luego, sin esterilizar el asa, se disemina perpendicularmente a la línea inicial (en orinas ¼ de placa). (Figura 2)

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 10 de 118
		Fecha: enero 2021

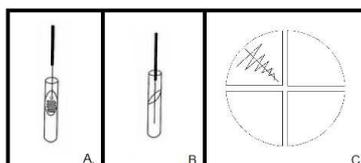


Figura 2: Siembra longitudinal de orina y LBA

f) **Siembra en medio líquido**

El tubo se debe inclinar y el material se extrae frotando el asa con la pared del tubo, en caso de muestra líquida o tórula se deposita en el fondo del tubo.

6.1.2 PROCESAMIENTO Y SELECCIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

En microbiología clínica, la experiencia y asociación entre el microorganismo, el tipo y sitio de la infección es de gran ayuda en la identificación preliminar.

La información clínica y tipo de muestra es fundamental para la selección del procedimiento, la correcta elección de los medios de cultivo a inocular y posteriormente sus condiciones de incubación.

Tabla: Inoculación de la muestra en medios de cultivo: selección de los medios de cultivo

TIPO DE MUESTRA	GRAM	SANGRE	MC	CHOCOLATE	T. MARTIN	CHAPMAN	TIOGLICOLATO	VIAL BACTE C
Secreción uretral	x				x			
Secreción ocular		x		x			x	
Secreción ocular RN		x		x	x			
Secreción nasal		x		x			x	
Secreción ótica		x	x	x		x	x	
Secreción ótica y gástrica RN		x		x				
Secreción nasofaríngea		x					x	
Expectoración	x	x	x	x		x		
Secreción traqueal		x	x	x				
Secreción bronquial		x	x	x				
Secreción herida		x	x			x	x	
Quemaduras		x	x			x	x	
Loquiocultivo	x	x	x		x		x	
LCR	x	x		x				Pediátrico
Líquido pleural	x	x	x	x				Adulto
Líquido sinovial	x	x	x	x	x			Adulto
Líquido ascítico	x	x	x					Adulto
Líquido amniótico	x	x	x					Adulto

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 11 de 118
		Fecha: enero 2021

- Las placas de agar Chocolate y Thayer Martin se deben incubar en microaerofilia
- Las muestras que vienen en medio de transporte no se les realizará tinción de Gram

COPROCULTIVO	Agar MC	Agar SS	Agar TCBS	Selenito	Agua Peptonada
UROCULTIVO	Agar Cromo	Agar Sangre	Agar MC		
HEMOCULTIVO POSITIVO	Agar Sangre	Agar MC	Agar Chocolate	Gram	

6.1.3 Responsabilidades

- En el área de procesamiento es el TP el responsable de la siembra primaria de las muestras en los medios establecidos, de realizar frotis, tinción y sedimento urinario en caso de ser requerido.
- El TM será responsable de la evaluación del cultivo, utilización de todas las pruebas necesarias para la identificación de las cepas en desarrollo, de realizar los antibiogramas y la validación del informe.
- La interpretación de resultados se basará fundamentalmente en el Crecimiento bacteriano en los diferentes medios selectivos, en la identificación bioquímica, en el análisis del antibiograma y en los datos clínicos.

6.1.4 Métodos de identificación

6.1.5 Procedimiento de Tinción de Gram

El TP es responsable de la realización del extendido, fijación y tinciones, mientras que el TM será responsable de la lectura, interpretación y de la validación del informe.

MATERIALES:

- Portaobjetos
- Asa estéril.

REACTIVOS:

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol-acetona
- Safranina.

EQUIPOS:

- Mechero
- Microscopio.

Procedimiento

- Hacer extendido en portaobjetos, fijar a temperatura ambiente o calor suave
- Cubrir completamente con cristal violeta al 1% por 60 segundos.
- Eliminar el exceso de colorante y lavar rápidamente con un chorro suave de agua, manteniendo la lámina en posición inclinada.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 12 de 118
		Fecha: enero 2021

- Cubrir la preparación con solución de Lugol, dejándola actuar por 60 segundos. Lavar nuevamente con agua.
- Decolorar con alcohol – acetona (1:1) durante 15 segundos. Lavar con agua.
- Cubrir con safranina, colorante de contraste, durante 30 segundos
- Lavar con agua, secar y observar al microscopio utilizando objetivo de inmersión.

6.1.6 Procedimiento técnico de métodos convencionales y rápidos de identificación de bacterias aerobias

El TM es responsable de la ejecución, lectura e interpretación de las técnicas para la identificación de microorganismos obtenidos de muestras clínicas y de la validación del informe. Recepción, control de calidad de los medios de cultivos y reactivos empleados en la identificación.

Pruebas bioquímicas que se realizan en el laboratorio

Catalasa: se usa para diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positiva) del género *Streptococcus* (catalasa negativa) y también otros tipos de bacterias como bacilos Gram positivos.

- Prueba en portaobjetos: transferir células bacterianas desde el centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjetos, agregar una gota de peróxido de Hidrógeno al 30%.

La rápida y sostenida aparición de burbujas de gas o efervescencia constituyen un resultado positivo.

Precauciones: si la colonia a estudiar fue cultivada en Agar Sangre, no arrastrar medio, pues los glóbulos rojos ahí contenidos darían un resultado falso positivo. Utilizar cultivos de 18-24 horas ya que colonias más viejas pueden perder su actividad y dar un resultado falso negativo.

DNAsa: permite identificar bacterias que poseen esta enzima, como es el caso de *Staphylococcus aureus*.

- Se realiza en una placa de medio sólido el cual tiene incorporado el DNA con un indicador (azul de toluidina o verde de metilo).
- Se debe inocular una colonia sospechosa en una estría de aproximadamente 2 centímetros en la placa de agar DNAsa, incubar 18-24 horas a 35-37 °C.
- Una prueba positiva está dada por la aparición de un halo rosado alrededor de la zona inoculada.

Sensibilidad a Bacitracina: permite identificar presuntivamente a *Streptococcus* β hemolítico Grupo A (*Streptococcus pyogenes*)

- Para esta prueba se utiliza un sensidisco de Bacitracina de 0.04 U.
- Se realiza un inóculo al 0.5 McF en caldo Todd Hewitt.
- Sembrar en césped con tórula una placa de agar Mueller Hinton enriquecida con sangre de cordero al 5% y depositar el sensidisco.
- Incubar 18-24 horas a 35-37 °C en una atmósfera de CO₂ (jarra con vela).

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 13 de 118
		Fecha: enero 2021

- Cualquier halo de inhibición indica una prueba positiva, correspondiendo a *Streptococcus pyogenes*.

Sensibilidad a Optoquina: permite identificar presuntivamente a *Streptococcus pneumoniae*

- Preparar inóculo al 0.5 McF en caldo Todd Hewitt y sembrar en césped una placa de Agar Mueller Hinton Sangre.
- Colocar el sensidisco de Optoquina (etilhidrocupreína) e incubar durante 18-24 horas a 35-37 °C en atmósfera de CO₂.
- La prueba será positiva si el halo de inhibición es ≥ 14 mm, correspondiendo a *Streptococcus pneumoniae*.

Sensibilidad a Novobiocina: permite diferenciar a *Staphylococcus saprophyticus* (resistente a novobiocina) de los demás *Staphylococcus* coagulasa negativa (sensibles).

- Realizar inóculo al 0.5 McF en caldo Mueller Hinton.
- Sembrar en césped una placa de Agar Mueller Hinton, depositar el sensidisco de Novobiocina (5 µg) e incubar 18-24 horas a 35-37 °C.
- Si el halo de inhibición es ≤ 10 mm la bacteria es resistente.

Test de Bilis/Esculina: es un medio selectivo y diferencial que permite discriminar entre *Enterococcus* y *Streptococcus* Grupo D de otros no Grupo D.

- Se debe disponer del medio Bilis/esculina extendido en tubos, el cual es de un color amarillo claro.
- Se inocula en forma de estrías en la superficie del tendido con las colonias sospechosas.
- Se incuba 18-24 horas a 35-37 °C.
- Reacción positiva: viraje del color de amarillo a negro (*Enterococcus* y *Streptococcus* Grupo D)
- Reacción negativa: no hay cambio en la coloración del medio.

Prueba de tolerancia a la sal: permite la diferenciación entre *Enterococcus* y *Streptococcus* Grupo D, además de otras bacterias Gram positivo.

- Se requiere de un medio de cultivo hipertónico que contiene 6.5% de cloruro de sodio, glucosa y púrpura de bromocresol como indicador.
- Se inocula una asada del cultivo en el tubo.
- Se incuban 24-48 horas a 35-37 °C.
- Solo las bacterias del género *Enterococcus* producen un viraje del indicador de púrpura a amarillo o desarrollo observado por turbidez; por lo tanto son tolerantes a esa concentración de sal.

Oxidasa: se utiliza para la identificación de la enzima citocromo oxidasa presente en algunas bacterias.

- Se utilizan discos comerciales impregnados del reactivo tetrametil-p-fenilendiamina.
- Se humedece el disco con una gota de agua destilada o suero fisiológico.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 14 de 118
		Fecha: enero 2021

- Con ayuda de una varilla de madera o plástico, recoger una o dos colonias del cultivo y ponerlas sobre el disco.
- Las bacterias que tienen actividad citocromo oxidasa (oxidasa positiva) desarrollan un color púrpura-rojizo en el sitio en 10 segundos.
- Las bacterias oxidasa negativa no producen color.

Medio MIO (movilidad - indol - ornitina): es un medio altamente utilizado para la diferenciación de Bacilos Gram negativo entéricos, sobre la producción de indol, la presencia de la enzima ornitina descarboxilasa y la capacidad de motilidad.

Contiene púrpura de bromocresol que servirá para verificar los cambios de pH del medio. La motilidad se observa por un desplazamiento del desarrollo microbiano desde el inóculo. La producción de indol debe ser lo último en verificar ya que se debe adicionar algunas gotas de reactivo Kovacs en la superficie del medio y puede interferir en la visualización de las otras pruebas.

Inoculación: sembrar las muestras mediante picadura vertical y profunda en el medio del tubo e incubar durante 18-24 horas a 35-37 °C.

Lectura e interpretación:

- Motilidad
Resultado positivo: el desarrollo microbiano se observa como un enturbiamiento del medio de cultivo en todo el tubo, o un desplazamiento fuera de la picadura de inoculación.
Resultado negativo: el desarrollo está restringido solo al área de inoculación.
- Ornitina descarboxilasa
Resultado positivo: se verifica como alcalinización del medio con un viraje a color púrpura
Resultado negativo: se observa acidificación del medio, con viraje a color amarillo.
- Producción de Indol, tras la adición de Kovacs
Resultado positivo: producción de un anillo de color rojo-fucsia, cualquier indicio de color es considerado positivo.
Resultado negativo: producción de un anillo color amarillo

Citrato: el agar citrato de Simmons es un medio diferencial utilizado para el estudio de Bacilos Gram negativo entéricos, sobre la base de la utilización de citrato como única fuente de carbono y la utilización de sales de amonio inorgánico como única fuente de nitrógeno. Tiene azul de bromotimol como indicador de pH.

- Se inocula en la superficie del tendido del tubo y se incuba 18-24 horas a 35-37 °C.
- Para la lectura e interpretación se debe observar el desarrollo de colonias en la superficie y el viraje del pH por alcalinización desde verde a azul que indicara un resultado positivo.
- El resultado será negativo si no se produce desarrollo ni cambio alguno en la coloración del medio

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 15 de 118
		Fecha: enero 2021

Ureasa: el agar Urea de Christensen es un medio ampliamente utilizado para la identificación de Bacilos Gram negativos entéricos, sobre la base de la degradación de la urea y alcalinización del medio por producción de amonio.

El medio contiene rojo fenol como indicador de pH.

- Se inoculan las colonias en picadura central y en la superficie del tendido del tubo, se incuba 18-24 horas a 35-37 °C.
- Para la lectura e interpretación se debe observar el cambio de color por alcalinización del medio desde un color anaranjado-amarillo a rojo-fucsia, que indicara un resultado positivo.
- Un resultado negativo se verá en un medio sin cambio de color.

Medio LIA: es un medio de cultivo ampliamente utilizado para la diferenciación de Bacilos Gram negativos entéricos, sobre la presencia de la enzima lisina descarboxilasa, la producción de H₂S y la producción de gas por la fermentación de la glucosa del medio.

Contiene púrpura de bromocresol como indicador del pH, citrato de amonio férrico y tiosulfato de sodio actúan como marcadores de la producción de H₂S.

En presencia de lisina descarboxilasa se observa como un viraje hacia el color purpura en todo el medio de cultivo, o bien como medio de cultivo sin cambio (neutro) en la columna de agar, mientras que su ausencia produce un cambio hacia el color amarillo en la columna y neutro en la zona inclinada.

La actividad de la lisina deaminasa produce un viraje del color a rojizo en la zona inclinada del tubo con fondo amarillo (bacterias que deaminan la lisina)

- Se siembra la muestra mediante estría en la superficie tendida y una picadura vertical y profunda en el centro del tubo.
- Incubar 18-24 horas a 35-37 °C.
- Lectura e interpretación: observar desarrollo bacteriano en el tendido y columna del tubo. Considerar el pH por alcalinización hacia el purpura (K) o acidificación (A) hacia el amarillo. Además se puede observar la producción de gas y la producción de H₂S como color negro en el tubo.

Lisina descarboxilasa

Resultado positivo: se verifica con la alcalinización (K) del medio con viraje del medio a color púrpura, o como medio de cultivo neutro

Resultado negativo: se observa acidificación (A) con viraje hacia amarillo en la columna del tubo y alcalinización en la zona inclinada.

Lisina deaminasa

Resultado positivo: producción de un color rojo granate (R) en la superficie inclinada

Resultado negativo: ausencia de color rojo granate.

Producción de gas

Resultado positivo: burbujas de gas o rotura de la columna de agar en el tubo por presión de gas acumulada en los tubos cerrados

Resultado negativo: no se observan burbujas

Producción de H₂S:

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 16 de 118
		Fecha: enero 2021

Resultado positivo: el desarrollo bacteriano produce una coloración negra en el medio de cultivo en todo el tubo.

Resultado negativo: ausencia de coloración negra.

Medio TSI: es un medio ampliamente utilizado para la diferenciación de Bacilos Gram negativo entéricos. Contiene rojo fenol como indicador de pH; dextrosa, lactosa y sacarosa como fuentes de energía y sustratos para la diferenciación basada en actividad fermentativa sobre azúcares, producción de gas, además de sulfato ferroso y tiosulfato de sodio como marcadores de la producción de H₂S.

Sembrar las muestras mediante estría en la superficie tendida y una picadura vertical y profunda en el centro del tubo, incubar 18-24 horas a 35-37 °C.

Lectura e interpretación: observar desarrollo en el tendido y en la columna del tubo, considerar el viraje del pH por alcalinización hacia el rojo (K) o acidificación (A) hacia el amarillo, además de observar la generación de gas y la producción de H₂S como color negro en el tubo.

Fermentación de carbohidratos

Resultado positivo: se observa acidificación (A) con viraje hacia el amarillo en la columna del tubo, incluyendo o no la superficie inclinada.

Resultado negativo: se verifica como alcalinización (K) del medio con un viraje hacia el rojo en todo el tubo o como medio de cultivo neutro.

Producción de gas

Resultado positivo: burbujas de gas o rotura de la columna de agar en el tubo por presión de gas acumulada en los tubos cerrados

Resultado negativo: no se observan burbujas.

Producción de H₂S

Resultado positivo: el desarrollo bacteriano produce coloración negra en el medio de cultivo en todo el tubo

Resultado negativo: ausencia de coloración negra.

Telurito de potasio: permite diferenciar entre especies del género *Enterococcus*, siendo positiva para *Enterococcus faecalis* y negativa para *Enterococcus faecium*.

- Se requiere para esta prueba una placa de agar Telurito de potasio.
- Sembrar una pequeña estría de colonia sospechosa en la placa.
- Incubar 18-24 horas a 35-37 °C.
- La prueba será positiva si hay desarrollo de colonias negras
- Si crecen colonias grises, la prueba es negativa.

Prueba de la pirrolidonil arilamidasa (PYR): es una prueba colorimétrica rápida para detectar actividad de la pirrolidonil-arilamidasa, con vistas a la identificación de *Enterococcus spp.*, *Streptococcus* del Grupo A, *Citrobacter* y *Klebsiella spp.*

- Se utilizan discos comerciales impregnados con el sustrato L-pirrolidonil-β-naftilamida.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 17 de 118
		Fecha: enero 2021

- Utilizando pinzas, colocar un disco en un portaobjetos limpio o en la tapa de una placa Petri que no tenga exceso de humedad.
- Humedecer levemente el disco con 5-10 µl de agua destilada con una micropipeta o un asa de inoculación de 10 µl. Precaución de no saturar el disco en exceso
- Con el asa esterilizada al calor, extraer una cantidad visible y gruesa del aislamiento en estudio y aplicarla al disco.
- Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos

- Añadir al disco 1 gota del reactivo revelador del color
- Esperar 1 minuto y leer el resultado.

Interpretación:

Prueba positiva: desarrollo de un color entre rosa y rojo en 1 minuto a partir de la adición del revelador del color.

Prueba negativa: sin cambio de color o color amarillo en un minuto a partir de la adición del revelador de color.

Test de detección de Carbapenemasas: Blue Carba.

Screening de Carbapenemasas para *Acinetobacter* spp. Enterobacterias y *Pseudomonas*. Utiliza discos comerciales: Imipenem(x2)+Br.Thymol Blue y Carb Negative Control Blue. Adicionalmente se necesita NaCl 9% ajustado a pH 8,5 (8,3-8,7)

- Utilizar placa de Agar sangre con cultivo de 24 hrs
- 2 tubos, uno para el test y uno para control
- Agregar 200 ul a cada tubo y una asada de cultivo. Vortear por 1 minuto y dejar 30 minutos a T° ambiente
- Agregar 1 tableta de Imipenem(x2)+Br.thymolBlue al test y 1 tableta de Carb Negative Control Blue al tubo control. Vortear 1 minuto e incubar 1 hora a 35°C.
- Un cambio de color azul a amarillo indica reacción Positiva.

Aislamiento con éter: permite aislar cocáceas Gram positivas (*Staphylococcus* y *Enterococcus*) de *Proteus* invasores y otras enterobacterias.

- En tubo cónico estéril realizar una emulsión de la colonia a aislar en 1 ml de suero fisiológico, evitando la formación de grumos.
- Agregar 1 ml de Éter Proanalysis (evitar contacto con mechero por peligro de inflamación).
- Agitar en vórtex durante 2 minutos.
- Dejar reposar durante 1 minuto.
- Sacar desde el fondo del tubo 50 µl de la emulsión, depositarla en el primer cuadrante de una placa de agar sangre y diseminar con el asa estéril.
- Incubar 18-24 horas a 35-37 °C.

6.1.7 ESTUDIO DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

El TM es responsable de definir el estudio, de la ejecución, la lectura e interpretación de los antibiogramas, del registro de resultados y de la validación del informe.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 18 de 118
		Fecha: enero 2021

6.1.8 Antibiograma por difusión en Agar (Técnica de Kirby-Bauer)

Estudio en que se define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado.

Los sensidiscos impregnados de los diferentes antibióticos, al contacto con el agar, difunden de manera radial, formándose una gradiente de concentración de éste.

Tras la incubación, los discos se ven rodeados por una zona de inhibición.

La concentración del antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida en métodos de dilución.

Existen diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. Por lo tanto, la lectura de estos halos se debe interpretar como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI, vigentes para cada año.

Insumos

- Placas de agar Mueller Hinton o Mueller Hinton Sangre
- Sensidiscos comerciales
- Tórulas estériles
- Tubo de vidrio de 16 mm de diámetro, con Suero Fisiológico 0,9 %, cantidad mínima 2 ml.
- Regla para medición de halos
- Pinzas
- Vórtex
- Estufa de incubación
- Densitómetro McFarland Den-1

Mantenimiento de los sensidiscos:

- Todos los sensidiscos deben permanecer con desecantes a temperaturas menores a 20 °C.
- Todos los catridge que están en uso permanecen refrigerados entre 2 y 8 °C.
- Imipenem siempre debe permanecer congelado para su uso.
- Retirar del refrigerador 15-20 minutos y del congelador 1 hora antes de ser utilizados.
- Solo aquellos discos con fecha de expiración del fabricante dentro del plazo pueden ser usados.

Preparación del inculo:

- Repicar con asa estéril 2 a 5 colonias aisladas y morfológicamente similares al tubo con SF.
- Ajustar turbidez del caldo hasta que sea comparable con el estándar de McF 0.5 (1-2 x 10⁸ UFC)

Inoculación de las placas:

- Antes de pasados 15 minutos de ajustada la turbidez del inculo, sumergir una tórula de algodón.
- Rotarla y presionarla contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de inculo.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 19 de 118
		Fecha: enero 2021

- Siembra en césped: Se inocula toda la superficie de una placa de agar Mueller Hinton o Mueller Hinton Sangre, sin dejar ninguna zona libre, pasando la tórula de izquierda a derecha en líneas, una tras otra hasta completar la placa, en tres direcciones, rotando la placa en 60° cada vez y terminar rodando por los bordes de la placa.

Aplicación de los sensidiscos

- Una vez sembrada la placa, esperar 5 minutos antes de aplicar los discos con ayuda de pinzas o dispensadores automáticos, a una distancia no menor a 24 mm entre centros, cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar.
- No más de 7 sensidiscos en placas de 10 cm y no más de 12 en placas de 15 cm.
- Un disco no puede ser relocalizado una vez que ya ha tomado contacto con el agar.
- Pasados 5 minutos de dispuestos los sensidiscos, las placas son invertidas y puestas en estufa a 35-37 °C, en atmosfera de CO₂ para las placas de Mueller Hinton Sangre.
- En *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.* los sensidiscos de Eritromicina y Clindamicina deben ser colocados a una distancia de 15-20 mm entre discos, para observar la probable resistencia inducible a Clindamicina.

Lectura e interpretación

- Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento.
- Los diámetros de la zona de inhibición (a ojo desnudo) son medidos en mm, pasando por el centro del disco, idealmente sobre un fondo negro iluminados con luz transmitida (la placa se mantiene hacia la luz).
- En caso de agar Mueller Hinton Sangre, las zonas son medidas en la parte superior del agar iluminado con luz reflejada sacando la tapa. Se debe tener precaución en medir la zona de inhibición y no la de hemolisis
- Si el microorganismo es *Staphylococcus spp.* o *Enterococcus spp.*, se requieren 24 horas de incubación estrictas y luz transmitida para examinar la zona de cefoxitina, oxacilina y vancomicina.
- Los tamaños de las zonas de inhibición son interpretados en las tablas CLSI (actualizadas anualmente) para ser informados como susceptibles, intermedio o resistente, además de los mecanismos de resistencia detectados.
- Se deben seguir las indicaciones respecto a consideraciones que dependen de la combinación de microorganismo y antibiótico.

6.1.9 Antibiograma por difusión en Agar (E-TEST)

Se utiliza para la determinación de susceptibilidad en determinados microorganismos en relación a ciertos antimicrobianos que no están estandarizados por la técnica de Kirby Bauer o es la recomendación vigente.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 20 de 118
		Fecha: enero 2021

Consiste en una tira de plástico que contiene una gradiente de concentraciones predefinidas de un antimicrobiano con diluciones seriadas. El protocolo para la preparación del inóculo es el mismo que para la difusión en disco.

Una vez inoculada la placa de agar con el microorganismo, retirar la tira del sobre con ayuda de una pinza estéril, sujetar por la parte superior donde se encuentra el logo y abreviatura del Antibiótico.

Colocar la tira en la superficie del agar, con la escala hacia arriba y el gradiente de concentración hacia abajo, produciéndose la difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. La CMI será el valor obtenido en el punto en que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.

6.1.10 MÉTODO AUTOMATIZADO

Se estudiarán de forma automatizada, en el equipo BD Phoenix M50, todos los Urocultivos, Hemocultivos, cultivos de secreciones y Líquidos de pacientes hospitalizados, de los que se obtenga desarrollo bacteriano como Enterobacterias, Bacilos Gram negativo no Fermentadores, bacilos gram negativo pleomorfos, bacilos gram positivo, sospecha de Staphylococcus y de Enterococcus; como también los Urocultivos de pacientes pediátricos y adultos mayores de 60 años de procedencia ambulatoria.

Este sistema cuenta con diferentes paneles, los que pueden ser solo para la identificación, solo para determinación de susceptibilidad o una combinación de ambos, tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas.

La identificación (ID) bacteriana se realiza mediante pruebas basadas en la utilización y degradación de sustratos específicos detectados por varios sistemas indicadores.

La determinación de susceptibilidad antimicrobiana (AST) es un test de microdilución que involucra exponer la bacteria a concentraciones decrecientes de agentes antimicrobianos, utiliza un indicador redox para detectar el crecimiento del microorganismo en presencia de estos agentes. La concentración más baja de antimicrobiano en la cual no tenga crecimiento visible es definida como concentración mínima inhibitoria (CIM).

BD Phoenix está habilitado en sus paneles AST para detectar Marcadores de Resistencia como BLEE en Enterobacterias, resistencia a Vancomicina en Enterococcus (VRE) y en S.aureus (VRSA) , Meticilinoresistencia en Staphylococcus , entre otras.

El sistema BD Phoenix está constituido por el equipo que contiene 50 estaciones para albergar los paneles, y el ordenador "todo en uno" que contiene la información para controlar el estado del instrumento, introducir y retirar paneles, configuración y mantención. Tiene conexión con lector de código de barra e impresora. Es compatible con la interfaz del sistema de administración de datos o LIS.

MATERIALES

Provistos:

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 21 de 118
		Fecha: enero 2021

- Paneles Phoenix
- Caldo ID Phoenix
- Caldo AST Phoenix
- Solución indicadora AST Phoenix
- Estación de inoculación Phoenix
- Panel de transporte Phoenix
- Nefelómetro BD PhoenixSpec™ y Estándares.
- Micropipeta de 25 µL
- Micropipeta de 50 µL
- Tapas de paneles Phoenix

Requeridos pero no provistos:

- Puntas estériles
- Reactivos para tinción de Gram
- Tómulas de algodón estériles
- Medios de cultivo no selectivos
- Estufa de incubación

IMPORTANTE: El equipo Phoenix debe estar siempre encendido. Si no lo está, se debe encender y dejar al menos 2 horas para que alcance la temperatura que necesita antes de cargar los paneles.

El manejo de los paneles debe ser cuidadoso, se deben tomar por los bordes evitando marcar, ensuciar u oscurecer el frente o la parte trasera del panel. No se debe cubrir ningún pocillo de reacción ni la secuencia del código de barras.

Paneles y caldos se mantendrán en el envase original a temperatura ambiente y podrán ser utilizados hasta la fecha de caducidad.

La solución indicadora AST debe almacenarse entre 2 y 8 °C y serán utilizados hasta la fecha de caducidad. Una vez abierto, el frasco tiene una duración de 14 días. Cada vez que se utilice, inmediatamente se debe refrigerar, si está más de 2 horas a temperatura ambiente se debe descartar.

Una vez agregado el indicador al caldo AST, este se puede mantener hasta 8 horas en oscuridad o dos horas expuesto a la luz, antes de cargar los paneles en el equipo.

PREPARACIÓN DEL CALDO Y EL PANEL

1. Una vez confirmada la tinción de Gram de las colonias a estudiar se debe seleccionar el panel adecuado para la inoculación. Se utilizarán los siguientes paneles:

UNMIC – 407	Susceptibilidad para Gram negativo (Urocultivo)
UNMIC/ID – 407	Identificación y Susceptibilidad para Gram negativo (Urocultivo)
NMIC/ID – 406	Identificación y Susceptibilidad para Gram negativo (Secreciones, Hemocultivos y Líquidos)
PMIC/ID – 89	Identificación y Susceptibilidad para Gram positivo

	Hospital Claudio Vicuña Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
		Página 22 de 118
		Fecha: enero 2021

(Todo tipo de muestras)



Figura 3: Paneles de identificación Phoenix

Examinar el envase y no utilizar el panel si el envase está roto o abierto. Sacar el panel del envase y descartar el desecante. No usar el panel si no contiene desecante o si está rasgado.

NOTA: los paneles se deben usar antes de dos horas de haber sido removidos del envase.

- Ubicar los paneles y los caldos, ID y AST, en la estación de inoculación, marcados con el número de cultivo.



Figura 4: Paneles, Caldos ID y AST Phoenix

- Usando técnica aséptica, escoger colonias bien aisladas y de igual morfología, con la punta de una tórula de algodón estéril desde los medios de cultivo.
- Suspender las colonias en caldo ID Phoenix (4.5 ml). Tapar el tubo y mezclar en vórtex por 5 segundos. Esperar al menos 10 segundos para que las burbujas vayan a la superficie.
- Confirmar la densidad del inóculo antes de cargar los paneles. Insertar el tubo en el Nefelómetro BD PhoenixSpec.
Si la densidad del inóculo es de 0.5 McF, el rango aceptable es entre 0.5 y 0.6. Si la densidad del inóculo es de 0.25 McF, el rango aceptable será entre 0.2 y 0.3. Si la densidad es menor se puede agregar colonias, mezclar en vórtex y releer la densidad. Si ésta excede se puede diluir usando sólo otro caldo ID y repetir la lectura.

NOTA: es importante retirar del tubo el exceso de inóculo usando una pipeta estéril para no sobrecargar el panel.

- Sosteniendo la solución indicadora AST en posición vertical, agregar una gota en caída libre al tubo con caldo AST. Si un volumen diferente es dispensado inadvertidamente, descartar el tubo y repetir el proceso.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 23 de 118
		Fecha: enero 2021

NOTA: Luego de ser utilizada, la solución indicadora AST debe ser inmediatamente refrigerada (2-8 °C).

- Si la densidad del inóculo es de 0.5-0.6 McF, transferir 25 µL de la suspensión bacteriana desde el caldo ID al caldo AST, si la densidad es de 0.20-0.30, transferir 50 µL.

En caso de utilizar la turbidez entre 0.20 y 0.30 se debe borrar con plumón permanente el pocillo A17 de la sección de ID del panel (Figura 5).



Figura 5: Borrado de pocillo A17 en panel Phoenix

- Mezclar el tubo con caldo AST que ya contiene el indicador y el inóculo bacteriano varias veces por inversión. Nunca mezclar en vórtex.
- Inocular los paneles, el caldo ID va en la sección ID del panel (51 pocillos) y el caldo AST en la sección AST (85 pocillos) permitiendo que el líquido llegue hasta el final. Si se utiliza un panel que solo es para determinación de susceptibilidad (AST), no inocular la sección ID.
- Ubicar las tapas de los paneles y presione hasta oír el clic. Hacer una inspección visual para asegurarse que todos los pocillos estén llenos.

NOTA: los paneles deben ser ingresados al equipo dentro de 30 minutos de ser inoculados. Se deben mantener en la estación de inoculación hasta que todo el líquido remanente sea absorbido en el fondo y serán transportados de manera vertical en el panel de transporte evitando golpearlos o moverlos bruscamente.

La solución indicadora AST, una vez abierta dura 14 días.

- Acceso del usuario: Haga clic en iniciar sesión y anote nombre de usuario y contraseña (se encontrará anotado en papel adosado al equipoy se renueva cada cierto tiempo). Ir a pantalla Registro de Paneles, pistolear el código de barras del panel y el código de barras de la muestra (contenida en la orden de trabajo), luego de hacer esto con cada uno de los paneles, pulsar indicador de apertura en la puerta del instrumento y ubicar los paneles en las estaciones provistas. Se podrán revisar más tarde los resultados en el software EpiCenter de BD.

Antibióticos usados para estudios de susceptibilidad (CLSI 2021)

UROCULTIVOS

**Gram (-)
Enterobacterias**

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 24 de 118
		Fecha: enero 2021

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Cefazolina 30 µg (ITU No complicada)	≥ 15	-	≤ 14	≤ 16	-	≥ 32
Cefazolina 30 µg (ITU complicada)	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 2	4	≥ 8
Nitrofurantoína 300 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 32	64	≥ 128
Cefotaxima 30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22	≤ 1	2	≥ 4
Cefpodoxima 10 µg	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 2	4	≥ 8
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 16	11-15	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 26	22-25	≤ 21	≤ 0,25	0,5	≥ 1
Gentamicina 10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
Ampicilina 10 µg	≥ 17	14-16	≤ 13	≤ 8	16	≥ 32

Para *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Serratia spp.* NO se informan cefalosporinas de 3° ni 4° generación.

COMPLEMENTARIO

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Amikacina 30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 16	32	≥ 64
Meropenem 10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Imipenem 10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Ertapenem 10 µg	≥ 22	19-21	≤ 18	≤ 0.5	1	≥ 2
Aztreonam 30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16
Piperacilina-Tazobactam 100/10 µg	≥ 21	18-20	≤ 17	16/4	32/4	128/4

BLEE

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Ceftazidima (CAZ) 30 µg	≥ 21	18-20	< 17	< 4	8	≥ 16
Cefotaxima (CTX) 30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22	≤ 1	2	≥ 4
CAZ+Ac. Clavulánico	≥ 5 mm CAZ					
CTX+Ac. Clavulánico	≥ 5 mm CTX					

Gram (+)

Staphylococcus spp.

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Novobiocina	R ≤ 10 para <i>S. saprophyticus</i>					

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3			
			Edición: segunda			
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 25 de 118			
			Fecha: enero 2021			

Nitrofurantoína 300 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 32	64	≥ 128
-------------------------------	------	-------	------	------	----	-------

Cefoxitina 30 µg (SCN)	≥ 25	-	≤ 24	-	-	-
Cefoxitina 30 µg (S. aureus)	≥ 22	-	≤ 21	≤ 4		≥ 8
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 16	11-15.	≤ 10	≤ 2/38	-	≥4/76
Gentamicina 10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
Doxiciclina 30 µg	≥ 16	13-15	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16

Gram (+)

Streptococcus spp.

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Ampicilina 10 µg	≥ 24	-	-	≤ 0.25	-	-
Nitrofurantoína 300 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 32	64	≥ 128
Doxiciclina 30 µg	≥ 16	13-15	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
Optoquina 5 µg (S. pneumoniae)	S ≥ 14 mm (S. pneumoniae)					
Bacitracina 0,04 U(S. β hemolítico)	S para S. β hemolíticos Grupo A					

Gram(+)

Enterococcus spp.

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Vancomicina 30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 4	8-16.	≥ 32
Ampicilina 10 µg	≥ 17	-	≤ 16	≤ 8	-	≥ 16
Nitrofurantoína 300 µg	≥ 17	15-16	≤14	≤ 32	64	≥128
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
Doxiciclina 30 µg	≥ 16	13-15	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
Linezolid 30 µg (hospitalizados)	≥ 23	21-22	≤ 20	≤ 2	4	≥ 8
Teicoplanina 30 µg (hospitalizados)	≥ 14	11,-13	≤ 10	≤ 8	16	≥ 32

SECRECIONES

Gram (-)

Enterobacterias

	Disco difusión (mm)			CMI (µg7ml)		
	S	I	R	S	I	R
Cefazolina 30 µg	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 2	4	≥ 8
Cloranfenicol 30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12	≤ 8	16	≥32

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3			
			Edición: segunda			
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 26 de 118			
			Fecha: enero 2021			

Cefotaxima 30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22	≤ 1	2	≥ 4
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 16	11-15.	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
Gentamicina 10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16

Gram (+)

Staphylococcus spp

	Disco difusión (mm)			CMI (µg7ml)		
	S	I	R	S	I	R
Eritromicina 15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13	≤ 0.5	1-4	≥ 8
Clindamicina 2 µg	≥ 21	15-20	≤ 14	≤ 0.5	1-2.	≥ 4
Penicilina 10 U	≥ 29	-	≤ 28	≤ 0.12	-	≥ 0.25
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 16	11-15.	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
Doxiciclina 30 µg	≥ 16	13-15	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
Cefoxitina 30 µg						
SCN	≥ 25	-	≤ 24	-	-	-
S. aureus	≥ 22	-	≤ 21	≤ 4	-	≥ 8
Vancomicina E-TEST (complementario)						
SCN	-	-	-	≤ 4	8,-16	≥ 32
S. aureus	-	-	-	≤ 2	4.-8	≥ 16
Rifampicina 5 µg (complementario)	≥ 20	17-19	≤ 16	≤ 1	2.	≥ 4

Gram (+)

Streptococcus β hemolíticos

Grupo A, B, C y G

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Penicilina 10 U	≥ 24	-	-	≤ 0.12	-	-
Clindamicina 2 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Eritromicina 15 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1

Gram (+)

Streptococcus

Grupo Viridans

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Eritromicina 15 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1

	Hospital Claudio Vicuña				Código: APL 1.3	
					Edición: segunda	
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología				Página 27 de 118	
					Fecha: enero 2021	

Clindamicina 2 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Vancomicina 30 µg	≥ 17	-	-	≤ 1	-	-
Cloranfenicol 30 µg	≥ 21	18,-20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16
Penicilina E-TEST	-	-	-	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Cefotaxima E-TEST	-	-	-	≤ 1	2	≥ 4

Gram (+)

S. pneumoniae

Sangre y LCR

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Penicilina E-TEST	-	-	-	-	-	-
no meningitis	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8
meningitis	-	-	-	≤ 0.06	-	≥ 0.12
Cefotaxima E-TEST	-	-	-	-	-	-
no meningitis	-	-	-	≤ 1	2	≥ 4
meningitis	-	-	-	≤ 0.5	1	≥ 2
Vancomicina 30 µg	≥ 17	-	-	≤ 1	-	-

Secreciones

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Oxacilina 1 µg	≥ 20	-	-	-	-	-
Levofloxacino 5 µg	≥ 17	14.-16	≤ 13	≤ 2	4	≥ 8
Vancomicina 30 µg	≥ 17	-	-	≤ 1	-	-
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.5/9.5	1/19-2/38	≥ 4./76
Clindamicina 2 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Eritromicina 15 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Cloramfenicol 30 µg	≥ 21	-	≤ 20	≤ 4	-	≥ 8

Streptococcus spp.

Secreciones

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Vancomicina 30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 4	8-16.	≥ 32
Penicilina E-TEST	-	-	-	≤ 0.12	0.25-2	≥ 4
Cefotaxima 30 µg	≥ 26	23-25	≤ 22	≤ 1	2	≥ 4
Clindamicina 2 µg	≥ 19	16.-18	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1
Eritromicina 15 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 0.25	0.5	≥ 1

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3			
			Edición: segunda			
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 28 de 118			
Fecha: enero 2021						

Cloramfenicol 30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 4	8	≥ 16
Optoquina (<i>S. pneumoniae</i>)	S ≥ 14 (<i>S. pneumoniae</i>)					
Bacitracina (<i>S. β</i> Hemolítico)	S para <i>S. β</i> hemolíticos Grupo A					

Gram (+)

Enterococcus spp.

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Ampicilina 10 µg	≥ 17	-	≤ 16	≤ 8	-	≥ 16
Vancomicina 30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 4	8-16.	≥ 32
Eritromicina 15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13	≤ 0.5	1.-4	≥ 8
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
Cloranfenicol 30 µg (Hemocultivo)	≥ 18	13-17	≤ 12	≤ 8	16	≥ 32
Linezolid 30 µg (Hospitalizados)	≥ 23	21-22	≤ 20	≤ 2	4	≥ 8
Teicoplanina 30 µg (Hospitalizados)	≥ 14	11--13	≤ 10	≤ 8	16	≥ 32
Gentamicina 120 (Hemocultivo)	≥ 10	7-9.	≤ 6	≤ 500	-	≥ 500

COPROCULTIVO

	Disco difusión (mm)			CMI (µg7ml)		
	S	I	R	S	I	R
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 16	11 -15.	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
Ciprofloxacino 5 µg (<i>Salmonella spp</i>)	≥ 31	21-30	≤ 20	≤ 0.06	0.12-0.5	≥ 1
Ampicilina 10 µg	≥ 17	14-16	≤ 13	≤ 8	16	≥ 32
Ceftriaxona 30 µg	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Cloranfenicol 30 µg (Extraintestinal)	≥ 18	13-17	≤ 12	≤ 8	16	≥ 32
Ácido Nalidíxico 30 µg (<i>Salmonella spp</i>)	≥ 19	14-18.	≤ 13	≤ 16	-	≥ 32
En caso de <i>Salmonella spp.</i> I o R a Ciprofloxacino, se prueba ácido nalidíxico como marcador. NO se informa						

BACILOS NO FERMENTADORES

Pseudomonas aeruginosa

	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Ceftazidima 30 µg	≥ 18	15-17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32

 HOSPITAL CLAUDIO VICUÑA SAN ANTONIO	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3	
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Edición: segunda	
			Página 29 de 118	
		Fecha: enero 2021		

Piperacilina-Tazobactam 100/10 µg	≥ 21	15-20	≤ 14	≤ 16/4	32/4-64/4	≥ 128/4
--	------	-------	------	--------	-----------	---------

Gentamicina 10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
Amikacina 30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 16	32	≥ 64
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 25	19-24	≤ 18	≤ 0,5	1	≥ 2
Imipenem 10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem 10 µg	≥ 19	16-18	≤ 15	≤ 2	4	≥ 8
Cefepime 30 µg (complementario)	≥ 18	15-17	≤ 14	≤ 8	16.	≥ 32

<i>Acinetobacter baumannii</i>	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Gentamicina 10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12	≤ 4	8	≥ 16
Amikacina 30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 16	32	≥ 64
Ampicilina-Sulbactam 10/10 µg	≥ 15	12-14.	≤ 11	≤ 8/4.	≤ 16/8.	≥ 32/16
Ciprofloxacino 5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	≤ 1	2	≥ 4
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 16	11--15	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Imipenem 10 µg	≥ 22	19-21	≤ 18	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem 10 µg	≥ 18	15-17	≤ 14	≤ 2	4	≥ 8
Cefepime 30 µg (complementario)	≥ 18	15-17	≤ 14	≤ 8	16	≥ 32

<i>Burkholderia cepacia</i>	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 16	11--15	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Ceftazidima 30 µg	≥ 21	18-20.	≤ 17	≤ 8	16	≥ 32
Cloranfenicol E-TEST	-	-	-	≤ 8	16	≥ 32
Levofloxacino E-TEST	-	-	-	≤ 2	4	≥ 8
Meropenem 10 µg	≥ 20	16-19.	≤ 15	≤ 4	8	≥ 16
Minociclina	≥ 19	15-18	≤ 14	-4	8	-16

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Disco difusión (mm)			CMI (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
Cotrimoxazol 1.25/23.75 µg	≥ 16	11--15	≤ 10	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Ceftazidima E-TEST	-	-	-	≤ 8	16	≥ 32
Cloranfenicol E-TEST	-	-	-	-8	16	-32
Levofloxacino 5 µg	≥ 17	14-16.	≤ 13	≤ 2	4	≥ 8
Minociclina	≥ 19	15-18	≤ 14	-4	8	-16

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 30 de 118
		Fecha: enero 2021

6.1.11 PROCEDIMIENTO DE UROCULTIVO

EQUIPO HByL

Sistema Uro-Quick para screening de orina, permite la ejecución rápida de los urocultivos con evaluación cuantitativa de la carga bacteriana indicados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Se obtienen resultados de orina Negativas a las 3 horas. Las muestras positivas son sembradas en los Medios de Cultivo adecuados para su posterior estudio de Identificación y Antibiograma.

La muestra de orina que ya viene en las condiciones adecuadas de toma de muestra y transporte debe ser sembrada a la brevedad.

Procedimiento:

- Extraer 0,5 ml de la muestra con pipeta automática y punta desechable estéril. Inocular perforando el tapón de goma del frasco a través del orificio del rack de dispensación, para posteriormente introducirlos en el equipo.
- Al encender el instrumento, el programa se activa mostrando el Menú principal.
- Tecla Analysis, accede al programa operativo, aparece Nuevo Análisis. El número entre paréntesis indica los cupos.
- Se indica las muestras a cargar con la tecla hacia arriba , colocando el correlativo que corresponda, clicar continuar.
- En ese punto se abre el cajón para colocar los frascos en orden a partir del punto uno. Cuando viene la siguiente carga, se hace el mismo procedimiento, continuando con la numeración .

Pasadas las 3 horas se analizan los resultados. Negativos se informan. Positivos se siembran en placa.

Nota: El equipo será utilizado en días hábiles. Fines de semana y festivos, las muestras de orina se sembrarán todas en placa.

MATERIALES:

- Placas de agar Mc Conkey
- Placas de agar sangre
- Placas de agar cromogénico para orina
- Placas de agar Cromo Candida
- Asa calibrada de 1µl y 10 µl
- Portaobjetos

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 31 de 118
		Fecha: enero 2021

- Cubreobjetos
- Diferentes pruebas de identificación microbiana.

EQUIPOS:

- Estufas de incubación
- Mechero.

La muestra debe ser sembrada dentro de dos horas de haber sido tomada, con un máximo de 4 horas. Siempre debe mantenerse refrigerada.

6.1.12 Muestras de Orina según su origen

Orinas de segunda micción y por catéter permanente

- agitar la muestra con movimientos suaves para homogeneizarla.
- introducir el asa, flameada y enfriada, inmediatamente por debajo de la superficie líquida sostenida en forma vertical y tomar una gota con el asa calibrada de 1 µl.
- sembrar en agar cromogénico para orina haciendo una línea central y luego haciendo estrías perpendiculares cruzando la línea original con el fin de obtener colonias aisladas. Sembrar 4 muestras por placa.
- repetir procedimiento en agar sangre y agar Mc Conkey

Orinas por sondeo

- proceder de la misma forma, pero utilizando el asa de 10 µl.

Orinas por punción vesical

- sembrar con asa de 10 µl placa de agar cromogénico de la misma manera, para hacer el recuento.
- sembrar con micropipeta 100 µl, extender con asa estéril por toda la superficie de una placa de agar sangre y Mc Conkey.

Para todos los tipos de muestra:

- incubar en estufa a 35-37 °C por 18-24 horas.
- Las placas incubadas son examinadas. Se observará la presencia o ausencia de desarrollo bacteriano y se decide el estudio. En cultivos positivos se determina recuento de colonias (UFC/ml), identificación del microorganismo y estudio de susceptibilidad.
- Recuento de colonias: N° de colonias x 1.000 (asa de 1 µl) o N° de colonias x 100 (asa de 10 µl)

Interpretación: Para interpretar los resultados se debe relacionar el recuento de colonias con la clínica del paciente, con el sedimento de orina o la tinción de Gram y con el método de recolección de la muestra.

Sedimento sugerente de ITU: leucocitos > 5-6 x campo de 40X y bacterias regular o abundante cantidad. La presencia de células descamativas y/o mucus es sugerente de contaminación.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 32 de 118
		Fecha: enero 2021

6.1.13 Sedimento Urinario Automatizado

Diariamente, antes de comenzar la revisión de las placas de cultivo, el TP debe ver en LIS si para cada muestra de urocultivo existe un sedimento urinario (sección de Orinas, lectura automatizada en equipo Urised). En el Folio dirá "bac".

Todas aquellas muestras que no tengan sedimento en la sección de Orinas, la TP de Bacteriología traspasará la muestra de orina a un tubo lector automatizado, luego de ser sembrada, y la llevará a la sección de orinas. En el Folio dirá "ker".

El TM de la sección de orinas es encargado de revisar e informar en LIS, pero serán validados una vez que sea revisado el cultivo, por el TM de Bacteriología.

En caso de discordancia entre las lecturas de sedimento y Urocultivo

(Considerar que el SED₁ ya fue informado, todas las repeticiones serán en equipo automatizado, excepto las muestras saturadas, que serán con lectura manual)

1. SED₁ (-), CULTIVO +, SED₂ +

Se informará el cultivo y el SED₂ con comentario alusivo a las diferencias con el primero. Se repitió sedimento con muestra de Urocultivo.

2. SED₁ (-), CULTIVO +, SED₂ (-)

Se hará una resiembra en medios de cultivo convencionales, si el cultivo es negativo se informará como tal. De resultar nuevamente un cultivo positivo, se realizará tinción de Gram del sedimento.

Se informará el resultado del cultivo positivo con el Gram y con sugerencia de repetir examen para confirmación.

3. SED₁ +, CULTIVO (-)

Se hará un SED₂, de resultar negativo o diferente del primero, se pide nueva muestra. De ser positivo se repite el cultivo agregando a la siembra un agar chocolate y en simultáneo se realiza tinción de Gram. De seguir negativo, se informa el cultivo negativo y el Gram, con la sugerencia de repetir examen para confirmación.

4. SED₁ (+), CULTIVO -, SED₂ -

Se informará el cultivo y el SED₂ con comentario alusivo a las diferencias con el primero. Se repitió sedimento con muestra de Urocultivo.

En caso de no contar con insumos para la lectura automatizada:

- Se recomienda usar tubos de vidrio cónicos de 10 a 12 ml, los que para su reutilización deben estar perfectamente limpios y secos.
- Las muestras se centrifugan por 10 minutos a 1800 RPM.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 33 de 118
		Fecha: enero 2021

- Se elimina el sobrenadante por una rápida inversión, dejando un volumen aproximado de 0,5 ml, el cual será resuspendido suavemente, evitando agitaciones fuertes. No agitar en vórtex ya que se destruirían los cilindros.
- Observar características físicas de la muestra para orientar la búsqueda.
- Análisis microscópico a 40X entre lamina y laminilla de 18 mm e identificar elementos formes presentes en la muestra.

Las muestras de orina deben guardarse refrigeradas hasta obtener el resultado del cultivo

Recuento de colonias (UFC/ml)	Método toma de muestra	Sedimento urinario	Microorganismos (MO) aislados	Interpretación, conducta recomendable
0 (<100 o 1000, según tipo)	-	normal	-	cultivo negativo
cualquier recuento	punción supra púbica y renal	independiente del resultado	cualquier MO	identificación y antibiograma
cualquier recuento	cualquier método y condición	independiente del resultado	cultivo puro de levadura	identificación
≥1.000	cateterización transitoria	independiente del resultado	≤ 2 especies uropatogenas	identificación y antibiograma
≥1.000	cualquier método en paciente varón	independiente del resultado	≤ 2 especies uropatogenas	identificación y antibiograma
≥10.000	segunda micción en paciente especial**	independiente del resultado	≤ 2 especies uropatogenas	identificación y antibiograma
≥10.000	cateterización permanente	patológico	≤ 2 especies uropatogenas	identificación y antibiograma
≥10.000	segunda micción	patológico	≤ 2 especies uropatogenas	identificación y antibiograma
≥100.000	segunda micción	patológico	2 uropatógenos y otro MO con recuento 10 veces menor	identificación y antibiograma, solo a uropatógenos
≥100.000	segunda micción	sin antecedente de sedimento	≤ 2 especies uropatógenas	identificación y antibiograma
≥100.000	-	-	≥3 MO, sin predominio	cultivo polimicrobiano,

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 34 de 118
		Fecha: enero 2021

				solicitar nueva muestra
--	--	--	--	-------------------------

6.1.14 PROCEDIMIENTO DE COPROCULTIVO

MATERIALES:

- Asa de siembra
- Tubo con agua peptonada alcalina
- Tubo con caldo selenito
- Placa de agar Mc Conkey
- Placa de agar SS
- Placa de agar TCBS
- Pruebas bioquímicas de identificación
- Sueros para aglutinación.

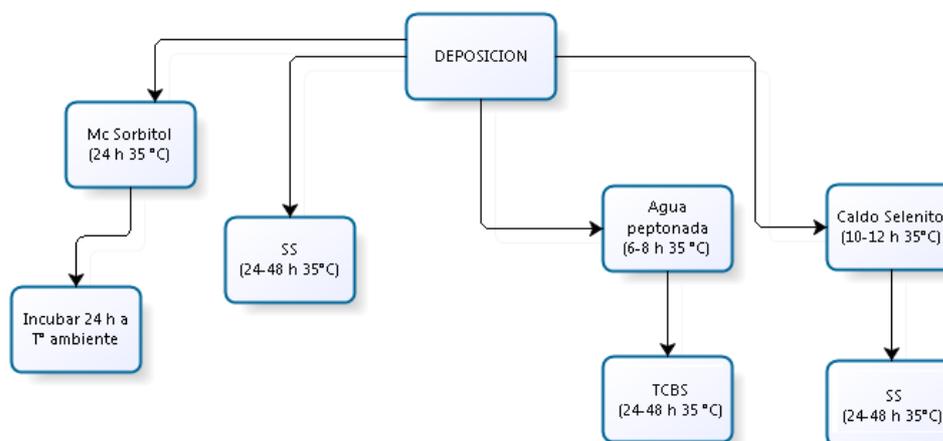
EQUIPOS:

- Estufa de incubación
- Mechero.

Las muestras deben venir en medio de transporte Cary-Blair y se deben mantener a temperatura ambiente hasta su procesamiento

- Sembrar con la tórula el primer cuadrante de la placa de Mc Conkey y SS, y diseminar con el asa esterilizada los primeros dos cuadrantes de la placa, volver a esterilizar y diseminar el resto.
- Incubar 18-24 horas a 35-37 °C.
Luego de la incubación, análisis y estudio si corresponde, la placa de Mc Conkey, será incubada durante 24 horas más a temperatura ambiente.
- Dejar la tórula por 6 horas a 35-37 °C en tubo con agua peptonada alcalina.
- Introducir en el tubo el asa de 10 µl estéril y sembrar una placa de TCBS por aislamiento, incubar hasta 48 horas a 35-37 °C.
- Dejar la tórula por 10-14 horas en tubo con caldo selenito a 35-37 °C.
- Sembrar placa de SS con asa estéril por aislamiento, incubar hasta 48 horas a 35-37 °C.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 35 de 118
		Fecha: enero 2021



6.1.15 Interpretación de las colonias y bacterias

Para el análisis, se estudia el número, morfología, olor, etc., características de las colonias obtenidas.

En MC, colonias sospechosas de *Escherichia coli* enterohemorrágica se estudian con una batería completa de enterobacterias que se confirmará con pruebas de aglutinación.

Nota: La bacteria ECEH se estudiará en caso dirigido con solicitud médica y diagnóstico de Síndrome hemolítico urémico.

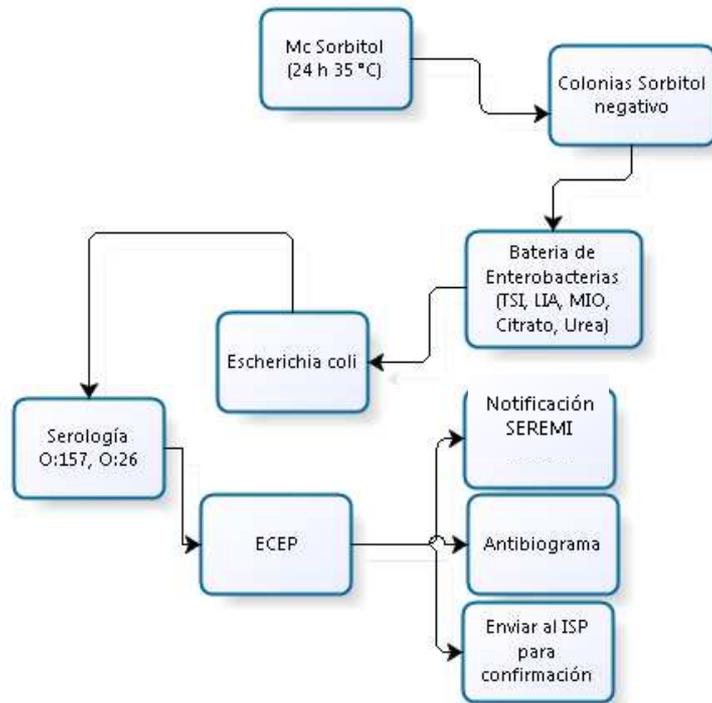
Para la identificación de colonias lactosa negativa sospechosas de *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* o *Yersinia spp.* se puede partir con una batería de 3 tubos: TSI, LIA y MIO que en un alto porcentaje permitirá hacer diagnóstico presuntivo y se podrá confirmar con pruebas de aglutinación.

Las colonias sospechosas de *Vibrio spp.* Serán sembradas en agar sangre, incubadas por 18-24 horas a 35-37 °C y confirmadas mediante prueba de oxidasa y batería completa, donde los medios TSI, LIA y MIO son preparados con 1% de NaCl.

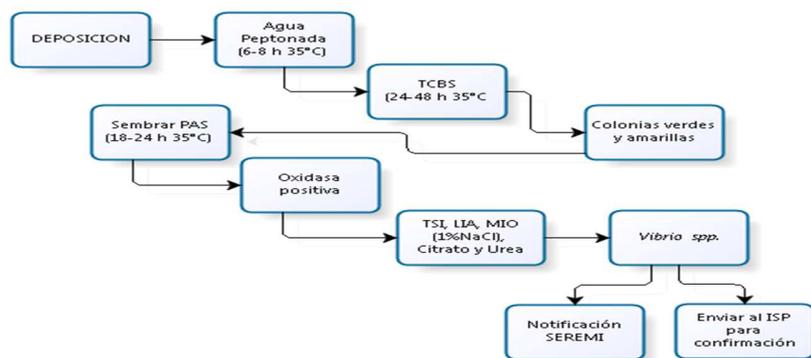
A todos estos microorganismos se les realizará un antibiograma, además son de notificación obligatoria y serán resembrados en agar para conservación de cepas y enviadas al ISP para confirmación.

a) DIAGNOSTICO PRESUNTIVO: *Escherichia coli* enterohemorrágica

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 36 de 118
		Fecha: enero 2021

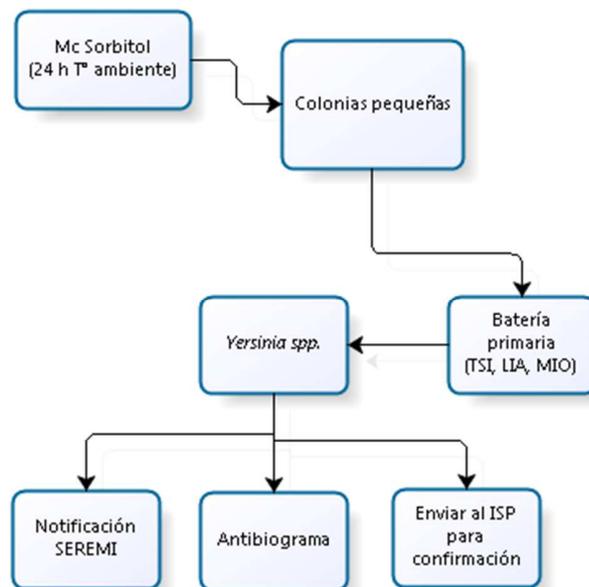


b)
DIAGNOSTICO PRESUNTIVO: *Vibrio spp*

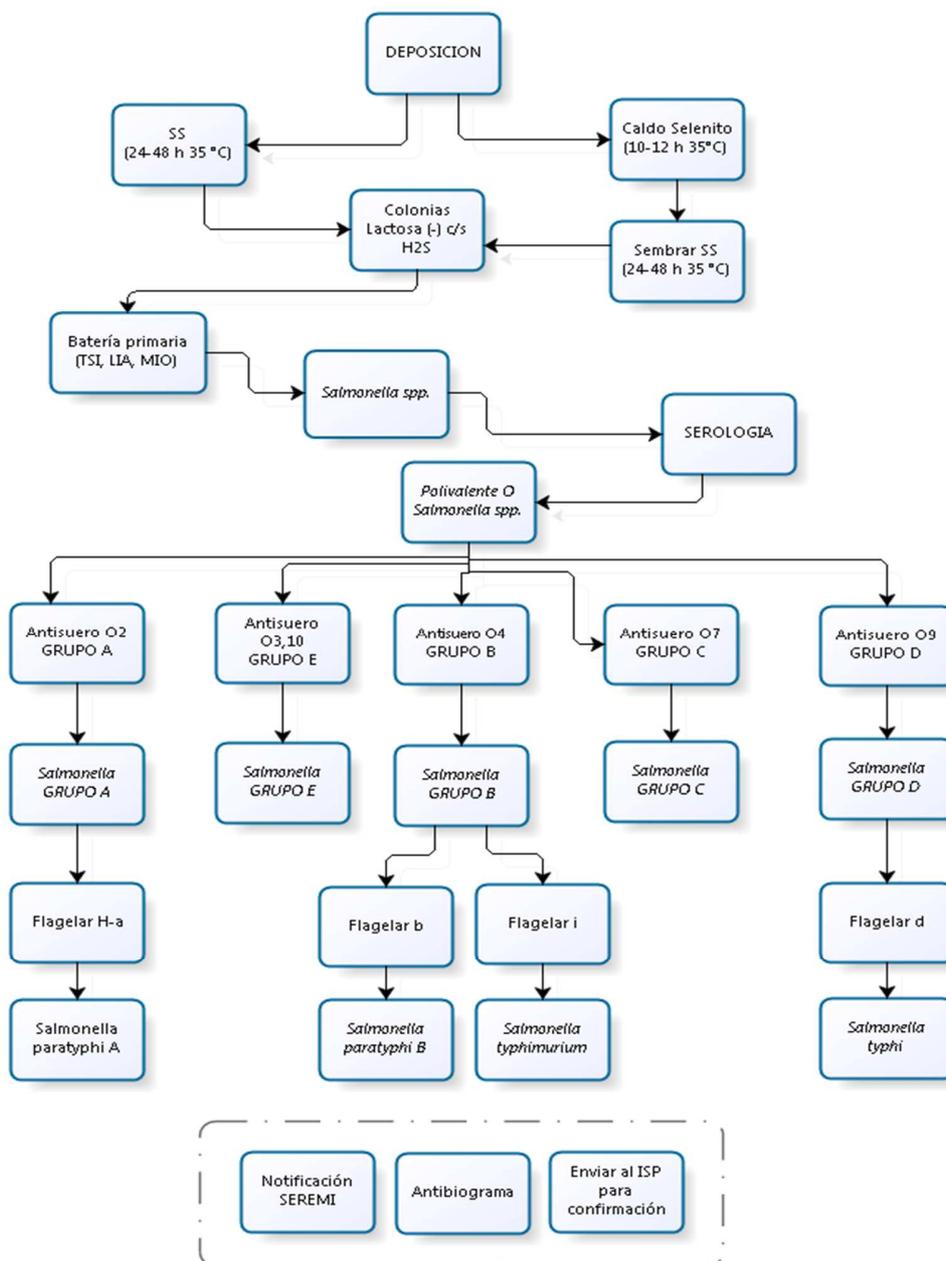


c) DIAGNOSTICO PRESUNTIVO: *Yersinia spp.*

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 37 de 118
		Fecha: enero 2021

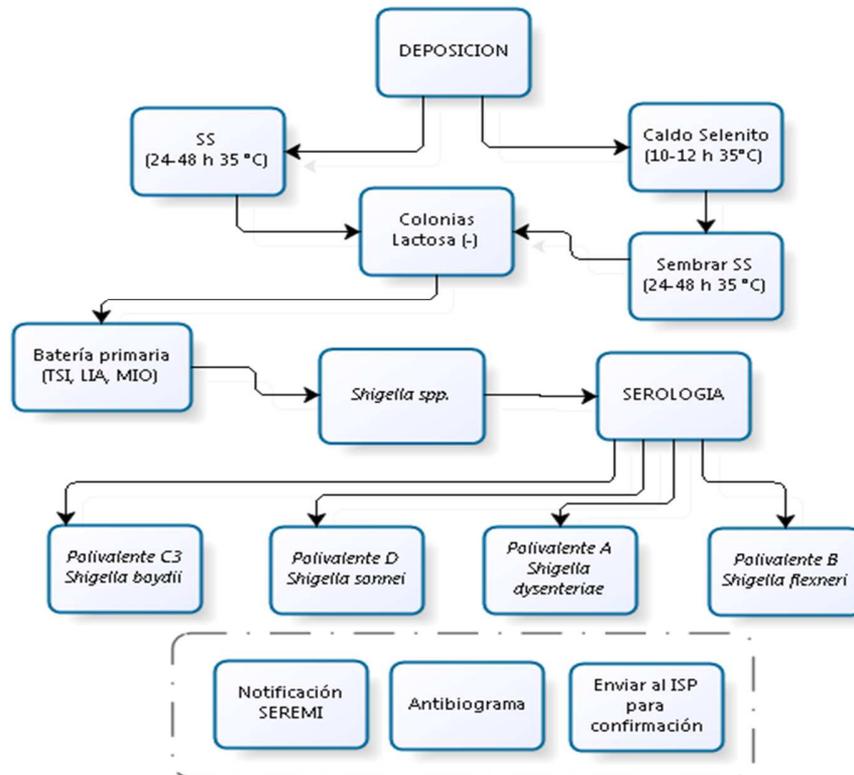


d) DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO: *Salmonella spp.*



e) DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO: *Shigella spp.*

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 39 de 118
		Fecha: enero 2021



6.1.16 PROCEDIMIENTO DE HEMOCULTIVOS

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 40 de 118
		Fecha: enero 2021

MATERIALES:

- Frascos de Hemocultivo aeróbico pediátrico y adulto
- Jeringas
- Portaobjetos
- Agar sangre
- Agar chocolate suplementado
- Agar Mc Conkey
- Agar Cromo Candida
- Pruebas para identificación
- Asa estéril
- Kit para tinción de Gram.

EQUIPOS:

- Equipo de Hemocultivo automatizado BACTEC FX 40, en adelante Bactec 1
- Equipo de hemocultivos automatizado BACTEC 9050, en adelante Bactec 2
- Estufa de incubación
- Mechero
- Microscopio.

Nota: Equipo Bactec 2 se utilizará cuando el primero se encuentre con capacidad completa.

Bactec 1:

El sistema está constituido por el equipo que contiene 40 estaciones para contener los viales, una Tablet con pantalla táctil y el escáner de códigos de barra.

Las muestras deben ser ingresadas lo antes posible por la Tens al equipo:

- Pulse la pestaña Status, el escaner de código de barras se activa.
- Escanee el código de barra del vial y el código de barra de la muestra. Los datos se ingresan automáticamente y pasan al Epicenter.
- Introducir el vial en una estación disponible (indicador verde fijo)
- La incubación está programada para 5 días. Pulse el botón modificar para aumentar o reducir el protocolo.

Notificación de viales Positivos : Alarma acústica , luz roja en la puerta y rojo intermitente en la estación. Abrir la puerta del instrumento, el escáner se activa, pistolear y procesar el vial.

Nota: El procedimiento de la muestra positiva es igual con ambos equipos

Notificación de viales Negativos: Luz verde en la puerta, indicador verde intermitente en la estación. Abrir la puerta y retirar.

Bactec 2:

Las muestras se reciben en viales de Hemocultivo y deben ser ingresadas inmediatamente al equipo por el TP:

- Detener el equipo presionando 2 veces el botón 
- Abrir la puerta del equipo
- Presionar botón para ingreso de vial  
- Escanear código de barras del vial y  programar los días que se incubará la muestra.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 41 de 118
		Fecha: enero 2021

- Poner el vial en la posición dada en la pantalla.
- Cerrar la puerta del equipo
- Anotar en la orden de trabajo la posición en que se dispuso el vial.
- Ingresar el código de barras de las muestras en Epicenter,

La incubación se realiza en el equipo BACTEC 9050 donde los frascos de hemocultivo estarán 5 días a 35 °C.

El caldo de cultivo contiene resinas que absorben las drogas antimicrobianas que pudieran estar presentes en la muestra.

El desarrollo bacteriano es pesquisado por un sensor que detecta la producción de CO₂ por parte de las bacterias.

El equipo emitirá una señal audible y luminosa en caso de que una muestra se encuentre positiva, en este caso se extrae el vial, se desinfecta la tapa con alcohol y con una jeringa se extrae la muestra.

Se aplica 1 gota en una placa de agar sangre, chocolate y Mc Conkey, realizando los correspondientes extendidos y se incuban a 37 °C hasta por 48 horas.

Las placas de agar chocolate deben incubarse en jarra con vela para generar atmósfera de 5% de CO₂.

Se aplica 1 gota en un portaobjetos para realizar tinción de Gram que deberá ser visto inmediatamente por el TM.

Interpretación:

- **Cultivo positivo:** cualquier desarrollo bacteriano es significativo. Se debe entregar inmediatamente un informe preliminar de la observación del Gram, según protocolo de valores críticos (AOC 1.3).
Se realizará la identificación bioquímica y antibiograma para el informe final.
- **Cultivo negativo:** se informa luego de los 5 días de incubación en el equipo automatizado.
- Consideraciones:

Hemocultivo alarma (+), sin observación de bacterias en la Tinción Gram:

1. Reingresar el frasco de Hemocultivo al equipo Bactec, incubandolo por el resto de días que le falten para completar los 5 días.
2. Pedir segunda opinión al profesional TM de la sección de Bacteriología, en el horario de lunes a viernes, de ser fin de semana o festivo al TM que ingresa al Sistema de Turno de Urgencia. , con respecto a la Observación de Gram. En este sentido proceder de la siguiente forma
 - a. Si ambos Tecnólogos no observan Bacterias en el gram, se espera el cultivo a las 48 horas
 - b. Si el Profesional que da la segunda opinión observa bacterias, este informará el valor crítico.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 42 de 118
		Fecha: enero 2021

6.1.17 PROCEDIMIENTOS DE MUESTRAS DE CATÉTER VENOSO CENTRAL (CVC) TÉCNICA DE MAKI

MATERIALES:

- Placa de agar sangre
- Asa estéril
- Pinzas estériles
- Pruebas diferenciales para identificación.

EQUIPOS:

- Estufa de incubación
- Mechero.

El catéter debe ser transportado en un frasco estéril a la brevedad al laboratorio. Con ayuda de una pinza, hacer rodar 5 cm de la punta del catéter, 4 veces hacia adelante y hacia atrás en la placa de Agar Sangre. La incubación se realiza a 35 – 37 °C hasta por 48 horas. Un recuento sobre 15 colonias es significativo. Se seleccionan las colonias a estudiar, se repican para realizar las pruebas bioquímicas de identificación, y se informará con su antibiograma correspondiente.

6.1.18 PROCEDIMIENTO DE MUESTRAS DE SECRECIONES

MATERIALES: medios de cultivo según tipo de muestra (ver tabla), pruebas diferenciales para identificación, asa estéril.

EQUIPOS: estufa, mechero.

A las muestras que no vengan en medio de transporte se le realiza una tinción de Gram y se deben sembrar a la brevedad.

Hacer siembra microbiológica en los medios de cultivo que corresponda, según tipo de muestra.

Se incuban las placas en estufa a 35-37 °C hasta por 48 horas (estudio de levaduras: Cromo Candida hasta por 72 horas), incluyendo las placas de agar sangre y agar chocolate en jarra con vela, para incubación en microaerofilia cuando sea necesario.

Para el análisis, se estudia el número, morfología, forma, hemólisis, olor y todas las características de las colonias obtenidas.

Una vez seleccionadas las colonias que se estudiaran, se repican para realizar las pruebas bioquímicas de identificación, y se realizan los antibiogramas correspondientes.

6.1.19 PROCEDIMIENTO DE MUESTRA DE LÍQUIDOS

a) Líquido cefalorraquídeo

MATERIALES:

- Medios de cultivo: agar sangre, agar chocolate suplementado

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 43 de 118
		Fecha: enero 2021

- Pruebas de identificación
- Jeringas
- Asa estéril
- Kit para tinción de Gram.

EQUIPOS:

- Equipos de hemocultivos automatizado BACTEC FX y BACTEC 9050
 - Estufa de incubación
 - Microscopio.
- Se debe agitar, idealmente, 1 ml de la muestra en vórtex y sembrar de inmediato una placa de agar sangre y agar chocolate por aislamiento e incubar hasta por 48 horas a 35-37 °C en microaerofilia.
 - Inocular aproximadamente 0.5 ml en vial de BACTEC pediátrico e incubar en equipo durante 3 días.
 - Detener el equipo presionando 2 veces el botón 
 - Abrir la puerta del equipo
 - Presionar botón para ingreso de vial 
 - Escanear código de barras del vial y programar 3 días que se incubará la muestra.
 - Poner el vial en la posición dada en la pantalla.
 - Cerrar la puerta del equipo
 - Anotar en la orden de trabajo la posición en que se dispuso el vial.
 - Hacer 2 extendidos y realizar tinción de Gram. En caso de un estudio citoquímico alterado, este debe ser visto a la brevedad y se entrega inmediatamente un informe preliminar, según protocolo de valores críticos (AOC 1.3).
 - A las 24 horas de incubación, el TM revisa las placas, si se observa desarrollo bacteriano se procede al estudio correspondiente.

Las placas serán eliminadas como negativas a las 48 horas de incubación.

El equipo BACTEC emitirá una señal audible y luminosa en caso de que una muestra se encuentre positiva, en este caso se extrae el frasco, se desinfecta la tapa con alcohol y con una jeringa se extrae la muestra.

Se aplica 1 gota en una placa rotulada como positiva (+) de agar sangre y agar chocolate realizando los correspondientes extendidos y se incuban a 35-37 °C hasta por 48 horas en microaerofilia.

Se aplica 1 gota en un portaobjetos para realizar tinción de Gram que servirá para guiar el estudio.

Interpretación:

Cultivo positivo: desarrollo bacteriano concordante con cuadro de meningitis. Se debe entregar inmediatamente un informe preliminar de la observación del Gram, según protocolo de valores críticos (AOC 1.3). Se realizará la identificación bioquímica y antibiograma para el informe final.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 44 de 118
		Fecha: enero 2021

Cultivo negativo: se informa luego de las 72 horas de incubación en el equipo automatizado.

Las muestras de LCR con análisis citoquímico alterado y cultivo negativo a las 24 horas, serán enviadas a la brevedad al ISP para estudio de PCR. Se debe enviar la muestra de LCR en criotubo y debe ir acompañada de una muestra de sangre en tubo tapa lila (EDTA).

b) Procedimiento Líquidos pleural, ascítico, amniótico, peritoneal y sinovial

MATERIALES:

- Medios de cultivo según tipo de muestra
- Pruebas para identificación
- Jeringas
- Asa estéril
- Kit para tinción de Gram.

EQUIPOS:

- Equipos de hemocultivos automatizado BACTEC FX 40 y BACTEC 9050
 - Estufa de incubación
 - Microscopio.
- Sembrar por difusión en Agar sangre, MacConkey y Chocolate, excepto el Líquido Peritoneal que se hará por aislamiento. Incubar a 35-37 °C hasta por 48 horas, Agar sangre y Chocolate en microaerofilia.
 - Inocular 8-10 ml en vial de BACTEC adulto e incubar en equipo durante 3 días.
 - Detener el equipo presionando 2 veces el botón 
 - Abrir la puerta del equipo
 - Presionar botón para ingreso de vial 
 - Escanear código de barras del vial y programar los días que se incubará la muestra.
 - Poner el vial en la posición dada en la pantalla.
 - Cerrar la puerta del equipo
 - Anotar en la orden de trabajo la posición en que se dispuso el vial.
 - Hacer extendido y realizar tinción de Gram.

Luego de la incubación, el TM revisa las placas, si se observa desarrollo bacteriano se procede al estudio correspondiente. Las placas serán eliminadas como negativas a las 48 horas de incubación.

El equipo BACTEC emitirá una señal audible y luminosa en caso de que una muestra se encuentre positiva, en este caso se extrae el frasco, se desinfecta la tapa con alcohol y con una jeringa se extrae la muestra.

Se aplica 1 gota en una placa rotulada como positiva (+) de agar sangre, chocolate y Mc Conkey realizando los correspondientes extendidos y se incuban a 35-37 °C hasta por 48 horas, chocolate y sangre en microaerofilia.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 45 de 118
		Fecha: enero 2021

Se aplica 1 gota en un portaobjetos para realizar tinción de Gram que servirá para guiar el estudio.

Interpretación

Cultivo positivo: desarrollo compatible con cuadro clínico. Se realizará la identificación bioquímica y antibiograma para el informe final, el cual va acompañado de la tinción de Gram.

Cultivo negativo: se informa luego de las 72 horas de incubación en el equipo automatizado, acompañado por la tinción de Gram.

6.1.20 PROCEDIMIENTO DE MUESTRAS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

MATERIALES:

- Medios de cultivo
- Pruebas diferenciales para identificación
- Asa estéril.

EQUIPOS:

- Estufa
- Mechero.

Piezas no triturables

- Si la pieza es pequeña, introducirla en un caldo de cultivo e incubar 24 horas tras lo cual se harán subcultivos a los medios necesarios.
- Si la muestra es grande, añadir al contenedor en el que se recibe 10-20 ml de caldo de enriquecimiento e incubar inmediatamente. Tras 24 horas realizar subcultivos a los medios necesarios.
- Se incuban las placas en estufa a 35-37 °C hasta por 48 horas, incluyendo las placas de agar sangre y agar chocolate en jarra con vela, para incubación en microaerofilia cuando sea necesario.

Para el análisis, se estudia el número, morfología, forma, hemólisis, olor y todas las características de las colonias obtenidas.

Una vez seleccionadas las colonias que se estudiarán, se repican para realizar las pruebas bioquímicas de identificación, y se realizan los antibiogramas correspondientes.

6.1.21 PROCEDIMIENTOS PARA LA BÚSQUEDA DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS

6.1.22 BÚSQUEDA DE *Neisseria gonorrhoeae*

MATERIALES:

- Placa de agar Thayer Martin
- Asa estéril
- Portaobjetos
- Kit de tinción de Gram
- Pruebas de identificación.

EQUIPOS:

- Estufa de incubación

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 46 de 118
		Fecha: enero 2021

- Mechero
- Microscopio.
- Sembrar muestras con tórula una placa completa de agar Thayer Martin, incubar hasta 48 horas a 35-37 °C en jarra con vela.
- Las colonias sospechosas serán vistas al Gram. En caso de observarse diplococos Gram negativos, la colonia será resembrada en Thayer Martin, repitiendo el proceso de incubación.
- Al día siguiente se le realizará un estudio semiautomatizado en BD BBL Crystal Identification System Kit. (Ver manual de uso).

El microorganismo debe ser notificado a la brevedad y la cepa enviada al ISP en placa de agar Thayer Martin para su confirmación. Esta debe ser resembrar cada 48 horas hasta su envío. Las especificaciones técnicas y formularios para procedimiento de envío de cepas, están disponibles en www.ispch.

Cuando la muestra es una secreción uretral, esta viene acompañada de un extendido el cual debe ser teñido y observado al microscopio.

La presencia de diplococos Gram negativos intracelulares es indicativo de una infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

Las muestras de Flujo Vaginal se reciben en diferentes modalidades: para Búsqueda de *Streptococcus* GRUPO B, búsqueda de *Neisseria gonorrhoeae* y un cultivo para búsqueda de cualquier microorganismo patógeno: Agar Sangre, Agar Thayer Martin y Cromo Candida. En caso de búsqueda de *N. gonorrhoeae*, viene acompañada de una muestra para observación al fresco entre lámina y laminilla. Esto para tener información acerca de otros patógenos como *Trichomonas vaginalis* o Levaduras.

6.1.23 BÚSQUEDA DE *Streptococcus* del GRUPO B

MATERIALES:

- Caldo Todd Hewitt suplementado con antibióticos selectivos para *Streptococcus* del GRUPO B.
- Agar Granada
- ChromID Strepto B
- Asa estéril.

EQUIPOS:

- Estufa
- Mechero

Dejar la tórula en tubo con caldo Todd Hewitt suplementado e incubar 3 horas a 35-37 °C. Sembrar con tórula en primer cuadrante de una placa de agar Granada y agar ChromID Strepto B, aislar con asa estéril.

Incubar hasta 48 horas a 35-37 °C.

Las colonias sospechosas serán de color naranja en agar Granada y color rosa-rojo en ChromID StreptoB.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 47 de 118
		Fecha: enero 2021

Una vez seleccionadas las colonias que se estudiarán, se repican para realizar confirmación con látex (grupos de Lancefield) y se realizan los antibiogramas correspondientes.

6.1.24 PROCEDIMIENTO EN LA VIGILANCIA DE ENTEROCOCOS RESISTENTES A VANCOMICINA Y VIGILANCIA DE CARBAPENEMASAS.

Las muestras de hisopado rectal son las de pacientes que ingresan al Hospital procedentes de otro Centro Hospitalario.

- a) Se utiliza un medio cromogénico selectivo VRE, para el cribado de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* que presentan una resistencia adquirida a la Vancomicina (VRE).

Serán sembradas con la tórula en una placa completa de agar VRE e incubadas hasta 48 horas a 35-37 °C.

Las colonias sospechosas, de color morado y/o verde esmeralda, serán resembradas en Agar Sangre e identificadas en Phoenix M50 con Panel de Gram Positivo, se informará susceptibilidad a Vancomicina, Linezolid y Teicoplanina.

- b) Se utiliza medio cromogénico selectivo en biplaca CARBA/OXA, para el cribado de Enterobacterias productoras de Carbapenemasas, en especial KPC , OXA y NDM.

Serán sembradas con la tórula en ambos lados de la placa e incubadas hasta 48 horas a 35-37°C.

Las colonias sospechosas de color verde o púrpura , serán resembradas en Agar sangre para realizar identificación en Phoenix M50 con Panel NMIC/ID y Test de BLUE CARBA al mismo tiempo. Se informará susceptibilidad a Carbapenémicos y Test Blue Carba, que en caso de ser Positivo se enviará cepa a ISP.

6.1.25 PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETECCIÓN DE HELICOBACTER PYLORI

La muestra debe ser contenida entre 2 y 8 °C hasta su procesamiento.

Para su análisis se debe revisar el inserto de la técnica.

La muestra se agrega al buffer contenido en el kit , se mezcla por agitación, para luego colocar 5 gotas en el test que contiene microesferas coloreadas unidas a los anticuerpos monoclonales contra H:pylori. Resultado en 10 minutos

6.1.26 PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETECCIÓN DE TOXINA A/B DE *Clostridium difficile*.

La muestra debe ser contenida entre 2 y 8 °C hasta su procesamiento.

Primero se hará la pesquisa de Glutamato deshidrogenasa (GDH), una enzima producida en grandes cantidades por cepas de *C. difficile* (toxigénicas y no toxigénicas), por lo tanto nos sirve de marcador para determinar la presencia del patógeno. Para su análisis se debe revisar el instructivo de la respectiva técnica.

Si el resultado es negativo, se informa GDH y toxina de *Clostridium difficile* negativo.

Si el resultado es positivo, se debe proceder a la búsqueda de la toxina:

Para su análisis se debe revisar el instructivo de la respectiva técnica.

Se realiza agregando la muestra de deposición al buffer contenido en el kit.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 48 de 118
		Fecha: enero 2021

Se mezcla y se analiza mediante un inmunoensayo rápido que detecta la presencia de la toxina.

El tiempo y la expresión de los resultados varía según el fabricante del kit reactivo, por eso se debe consultar el inserto.

6.1.27 PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETECCIÓN DE *Ureaplasma urealyticum* y *Mycoplasma hominis*.

Antes de tomar la muestra, debe coordinarse con el profesional a cargo del procesamiento del examen, para preparar los reactivos y realizarlo de inmediato.

La muestra debe ser contenida en oscuridad hasta su procesamiento.

Para su análisis se debe revisar el instructivo de la respectiva técnica.

Las muestras cervicales y uretrales son inoculadas en caldos nutritivos y selectivos que permiten el desarrollo de estos microorganismos.

La prueba consta de una galería con sustratos específicos y un indicador de pH que permitirán, en un cultivo positivo, visualizar un cambio de color del caldo vinculado a un aumento del pH y así conocer el recuento y la susceptibilidad.

Consultar el inserto para control de calidad, lectura e interpretación de la prueba.

6.1.28 PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETECCIÓN DE *Chlamydia trachomatis*

La muestra debe ser contenida entre 2 y 8 °C hasta su procesamiento.

Para su análisis se debe revisar el instructivo de la respectiva técnica.

Las muestras cervicales y uretrales se analizan mediante un inmunoensayo rápido que detecta la presencia del microorganismo.

El test contiene microesferas coloreadas unidas a anticuerpos monoclonales anti-*Chlamydia* específicos de género.

Consultar el inserto para control de calidad, lectura e interpretación de la prueba.

6.1.29 PROCEDIMIENTO PARA TEST RÁPIDO DE INFLUENZA A/B VRS

EQUIPOS:

- Gabinete de Bioseguridad
- Equipo F400 (Lectura de Test Rápidos)
- Cronómetro

MATERIALES:

- Muestra de Aspirado Nasofaríngeo
- Buffer de extracción
- Pipetas provenientes del kit
- Cassettes provenientes del kit (VRS e Influenza A y B)

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 49 de 118
		Fecha: enero 2021

- Tapas con filtros provenientes del kit
- Controles Positivos y Negativos provenientes del kit

Siempre se debe trabajar bajo las medidas de Bioseguridad correspondientes (uso de pechera, guantes, mascarilla respiratoria y bajo Gabinete de Bioseguridad).

La muestra se mantendrá refrigerada hasta su procesamiento (2 a 8°C).

Para aspirado nasofaríngeo:

- La muestra se debe mezclar con vortex durante 10 a 15 segundos.
- Con pipeta se debe extraer hasta llenar completamente (volumen fijo) y se debe agregar a Buffer de extracción mezclando por aspiración mínimo 5 veces.
- Sacar los cassetes de VRS e Influenza de los envoltorios y verificar si están en buen estado (gel de sílica color amarillo). Agregar 4 gotas de la mezcla Buffer-Muestra a cada cassette y esperar durante 15 minutos.
- Cumplidos los 15 minutos en equipo presionar en pantalla táctil "Solo lectura" poner ID de usuario e identificador de muestra (número interno) y esperar a que el equipo muestre inserte dispositivo (Nota: el equipo reconoce la técnica por el código de barras en la parte superior de cada cassette).
- Esperar lectura y sacar papel con resultados.
- **Interpretación de resultados:** los resultados aparecen con un índice denominado COI que da cuenta de la fluorescencia captada por el equipo. Por defecto el punto de corte proveniente del equipo es COI: 1, eso quiere decir, que para valores inferiores a COI: 1 el equipo lo interpreta como Negativo y para valor mayor o igual a COI: 1 los da como positivo, sin embargo, para valores correspondientes entre COI: 1 a 10 los resultados no se corresponden completamente con lo observado por técnica de Inmunofluorescencia Directa, por lo cual los valores entre COI: 1-10 se deben informar como: **No concluyente, a la espera de IFD.**
- Registrar y validar en LIS.

Para otros tipos de muestras (cepillado/torulado nasofaríngeo) referirse al inserto del Kit.

Nota: para procesamiento de controles se debe realizar los mismos pasos utilizando la indumentaria proveniente de cada kit. Clave de administrador del equipo: 0000

Calibración Equipo:

- El equipo está configurado para que cada mes solicite una calibración, para lo cual se utilizarán los cassettes de calibradores los cuales están guardados en el primer cajón del mesón de trabajo con cultivos.
- Son 3 cassettes: CAL-1, CAL-2 y CAL-3
- Presionar en pantalla táctil del equipo "Calibración", ingresar ID y esperar a que pida un calibrador e insertar el calibrador requerido.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 50 de 118
		Fecha: enero 2021

- Una vez terminado el procedimiento guardar el papel que arroja la calibración de equipo y dejar registro.

6.1.30 PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA DETECCIÓN DE ANTIESTREPTOLISINA O (ASLO)

Para su análisis se debe revisar el instructivo de la respectiva técnica.

Se realiza agregando igual cantidad de la muestra de suero y el látex reactivo.

Luego se agita por rotación durante 2 minutos y se observa aglutinación macroscópica.

En caso de resultar positivo (aglutinación visible) se debe hacer dilución continua seriada de la muestra para determinar el título.

En paralelo con cada muestra, se realiza control de calidad con el control positivo contenido en el kit.

La expresión de los resultados varía según el fabricante del kit reactivo, por eso se debe consultar el inserto.

6.1.31 PROCEDIMIENTO TÉCNICO EN EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE SÍFILIS

La sífilis es una infección de transmisión sexual (ITS) para la cual el diagnóstico se basa en 3 grupos de pruebas: por examen directo mediante microscopía de campo oscuro e inmunofluorescencia indirecta, por serología y por cultivo celular.

En nuestro laboratorio se realizan pruebas serológicas, de las cuales también hay dos tipos: las pruebas No Treponémicas como VDRL y RPR, y las pruebas Treponémicas como el MHA-TP.

A modo de screening se utiliza la técnica de RPR donde se descartan los resultados negativos, los positivos se titulan con VDRL y son confirmados con MHA-TP.

Todas las muestras serán tomadas en tubos con gel separador de coágulo. El TP de la recepción (dependiendo el horario) es responsable de verificar el nombre del tubo con la orden de examen, la cual debe traer todos los datos necesarios para el correcto análisis (nombre completo, RUT, Fecha de nacimiento, sexo, dirección, grupo de pesquisa, fecha de toma de muestra, firma y timbre del médico/matrona solicitante), además las solicitudes por agresión sexual deben venir junto a la cadena de custodia, la que debe ser completada por el TP que recibe.

Las muestras aceptadas son recepcionadas en el LIS, dependiendo del caso, se escanea directamente el código de barras, o en su defecto es ingresado, por la secretaria al sistema y se le asigna un código de barras que también debe ser recepcionado. Se ingresan como RPR para screening o como RPR custodia cuando la muestra corresponde a abuso sexual.

Las muestras, centrifugadas a 3000 RPM durante 6 minutos, pasan a la sección Serología de sífilis, la TP revisa planillas, órdenes y tubos.

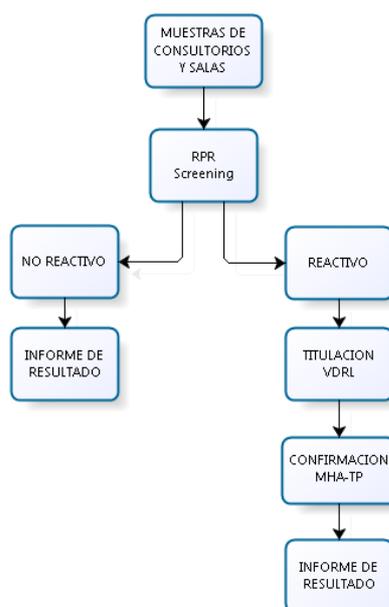
Cualquier no conformidad con lo señalado y que genere un motivo de rechazo según el manual de toma de muestras, se avisará inmediatamente vía telefónica al servicio clínico

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 51 de 118
		Fecha: enero 2021

correspondiente para el envío de nueva muestra, se debe registrar en LIS a quien se le avisa; en el caso de otras procedencias (usuarios externos) se procede al rechazo de la muestra vía LIS, se valida e imprime.

En caso de rechazo de muestras por agresión sexual, el TM debe llenar el formulario de cadena de custodia, dicho formulario se entrega junto con el informe de rechazo.

ALGORITMO DE SEROLOGÍA DE SÍFILIS



6.1.32 PRUEBA CUALITATIVA RPR (SCREENING)

La suspensión del antígeno de RPR es un antígeno de cardioplipina con partículas de carbón que detecta la presencia de “reagina”, sustancia similar a los anticuerpos presentes en suero de personas sífilíticas y con otras patologías. Esta reagina se liga al antígeno de la prueba, que consiste en partículas de colesterol cubiertas de cardioplipina y lecitina, lo que produce una floculación macroscópica.

En el laboratorio se realiza el examen de RPR de dos maneras: Equipo Automatizado AIX 1000 (Horario rutina) y Manual (Fines de semana).

RPR Automatizado AIX 1000

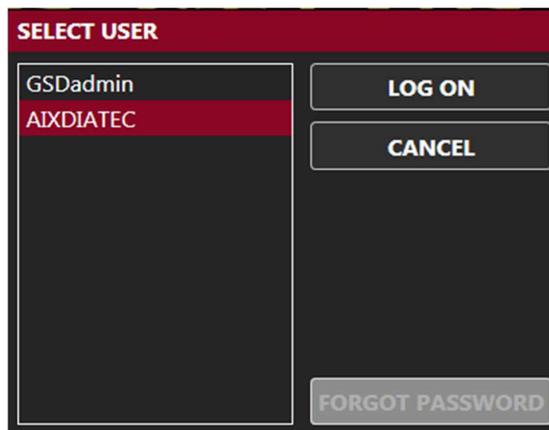
- **Equipos**
 - AIX 1000.
 - Computador asociado a AIX 1000
- **Reactivos y materiales:**

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 52 de 118
		Fecha: enero 2021

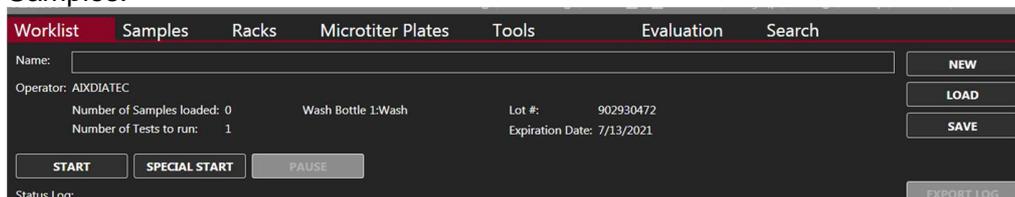
- PBS preparado.
- Antígeno AIX 1000 (Carbón).
- Solución Decon (Descontaminante).
- Controles: Reactivo y No Reactivo.
- Placas de reacción.

● **Procedimiento**

1. Se deben dejar atemperar los reactivos a temperatura ambiente (25°C aproximadamente), durante mínimo 30 minutos.
2. Posteriormente encender el computador asociado a AIX 1000, luego esperar a que se despliegue pantalla de inicio donde se debe seleccionar usuario para inicio del computador con contraseña "ITDIATEC", luego se despliega una ventana del software de equipo donde se ingresa al usuario "AIXDIATEC" con contraseña "ITDIATEC".



3. Una vez realizado lo anterior el equipo se inicializará, donde paso a paso va solicitando ciertas mantenciones que se le realizan diariamente y semanalmente (explicado en Mantenimiento de equipo y Control de Calidad).
4. En el espacio donde dice Name escribir fecha de procedimiento, luego ir a pestaña Samples.



5. En esta pestaña pinchar en recuadro donde dice "Add Samples" se desplegará una lista donde se debe presionar "Add Samples to Worklist", luego pide elegir el esquema de control de calidad hay que dejar el "Controls only on first plate" y presionar OK.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 53 de 118
		Fecha: enero 2021

Worklist Samples Racks Microtiter Plates Tools Evaluation Search

Add Samples ▾ MULTIPLY SAMPLES x 2 + - REMOVE SAMPLES

#	SAMPLE ID	Rack Position	AIX RPR RevE No Action	AIX RPR RevE Screen Action	AIX RPR RevE Low Titer Action	AIX RPR RevE High Titer Action
---	-----------	---------------	------------------------	----------------------------	-------------------------------	--------------------------------

ADD SAMPLES

 Please specify a Control Scheme to be used with the Samples being added.

Control Scheme:

OK

- Para agregar muestras se debe escanear el código de barras de cada muestra con la opción Scan marcada y presionar "ADD", en ese momento se activará el código de barras y se podrá leer cada código y asignarlo en un espacio del rack. En este momento es recomendable realizar la revisión de los tubos con las órdenes de exámen de sífilis y debe cuadrar la cantidad de órdenes con todos los tubos.

ADD SAMPLES

 Select a Sample Entry Method below and click Add to add Samples.
The Scan Sample Entry Method allows the user to read the Sample IDs from the Sample tubes using the barcode scanner as they are added to the worklist.

Sample Entry Method

Manual Sample ID:

Auto Increment Sample ID Template:
{0} = auto incremented number Start Number:

Scan

Import

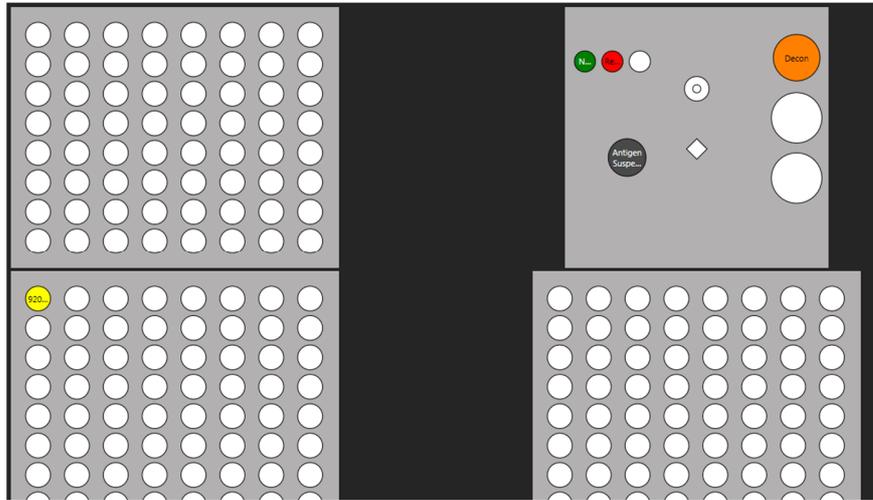
Pre-loaded Sample Rack

ADD **DONE**

- Luego de escanear todos los tubos se debe presionar "DONE"
- Verificar que aparezcan todas las muestras en el listado correspondiente.

#	SAMPLE ID	Rack Position	AIX RPR RevE No Action	AIX RPR RevE Screen Action	AIX RPR RevE Low Titer Action	AIX RPR RevE High Titer Action
1	9200282972	2:1	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 54 de 118
		Fecha: enero 2021



9. Posteriormente ir a pestaña Microtiter Plates para ver la cantidad de placas a usar además de excluir los espacios ya ocupados de estas placas (se pueden reusar los espacios vacíos de las placas ya utilizadas).

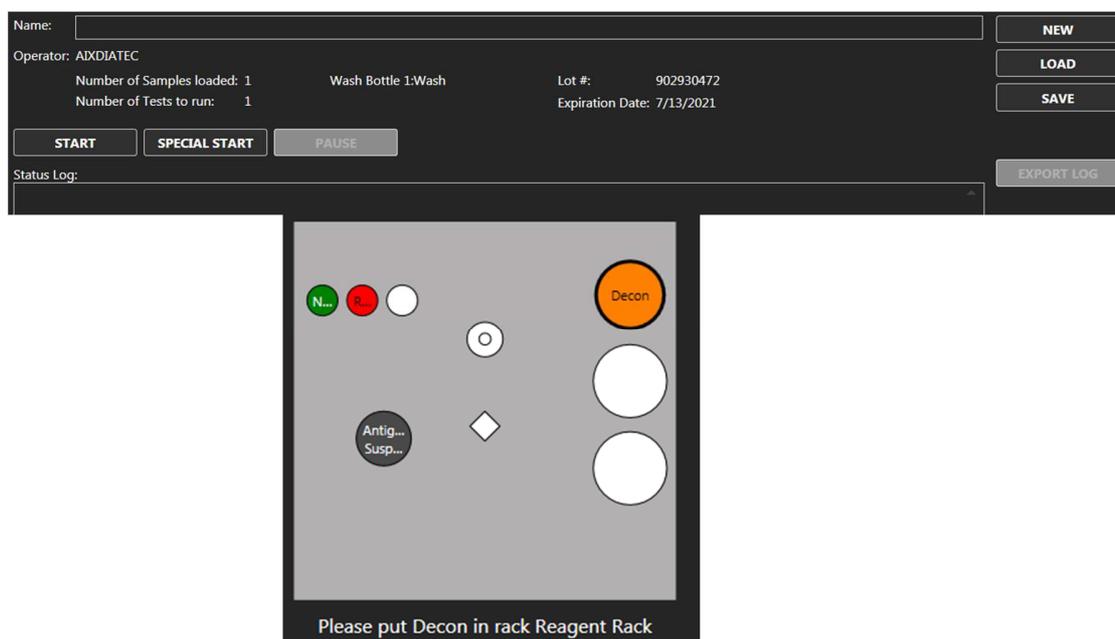
Worklist		Samples	Racks	Microtiter Plates	Tools	Evaluation	Search
Add Samples		MULTIPLY SAMPLES x 2		REMOVE SAMPLES			
#	SAMPLE ID	Rack Position	AIX RPR RevE No Action	AIX RPR RevE Screen Action	AIX RPR RevE Low Titer Action	AIX RPR RevE High Titer Action	

	A	B	C	D	E	F
8						
7						
6						
5						
4						
3						
2						
1	Non React...	React. Cont.	9200...			

EXCLUDE WELLS

10. Se deben agregar los reactivos y placas (letras hacia el frente) a utilizar a sus espacios correspondientes, el antígeno posee un agitador magnético que no debe eliminarse, el decon y los controles correspondientes (Reactivo y No reactivo).
11. Una vez verificados todos los componentes para la realización de la técnica se debe volver a la pestaña Worklist y presionar Start. El software indica cuanto reactivo se debe utilizar y va haciendo un paso a paso. Una vez termina se debe cerrar la tapa delantera y el equipo comenzará a realizar la técnica.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 55 de 118
		Fecha: enero 2021



Mantenimiento de equipo y control de calidad

Para la mantención del equipo se requieren ciertos mantenimientos que se realizan diariamente y otros semanalmente. Además del procesamiento y registro del control de calidad.

Mantenimiento del equipo

Diario: se realizan 10 lavados con Buffer PBS que lo pide al iniciar el equipo, luego se debe limpiar el panel debajo de los racks se muestras con una gasa con alcohol al 70° y se deben devolver los racks a su posición, posteriormente se realiza una limpieza del polvo con una gasa limpia, al terminar de procesar las muestras correspondientes se debe lavar 50 veces con agua destilada las mangueras interiores, este mantenimiento lo pide siempre al apagar el equipo y lo realiza de manera automática, solamente hay que fijarse que la botella de agua destilada esté correctamente instalada.

Semanal: una vez a la semana se deben hacer 20 lavados con una solución de cloro al 1%, también se debe verificar semanalmente la botella de desechos y eliminarlos por lo menos una vez a la semana, verificar semanalmente que la solución de PBS no contenga partículas que no correspondan ya que es una solución cristalina, se deben limpiar los racks de muestras 1 vez a la semana. También existe una mantención que la realiza el servicio técnico que es alineamiento de instrumento y alineamiento de cámara, uno debe verificar que semanalmente estos se encuentren en buen estado, verificando estas dos mantenciones.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 56 de 118
		Fecha: enero 2021

Tanto las mantenencias diarias como semanales se deben registrar en planilla excel descrita.

Registro mantenencias AIX 1000																
																
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Responsable: TM. Jorge Ortiz  </div>																
N°serie: 151115-429AG				Mes: Mayo				Año: 2021								
Día	Mantenimiento Diario				Mantenimiento Semanal				Mantenimiento Quincenal			Servicio Técnico	Responsable	Fecha	Hora	
	Encendido	Apagado			Cebado con solución de cloro al 1%	Limpieza botella desechos	Limpieza botella buffer	Limpieza racks de muestras	Alineamiento de Instrumento	Limpieza exterior y sensores de liquido	Alineamiento de cámara	Otras mantenciones				
	Lavado con buffer	Limpieza panel inteligente con gasa con alcohol	Limpieza plataforma gasa limpia	Cebado con agua destilada												
1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
6	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
7	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
9	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				

Control de calidad

Los controles de calidad se deben procesar cada vez que se realicen las técnicas correspondientes, siempre se deben cumplir, en el caso de un no cumplimiento se deben analizar las causas correspondientes y buscar una solución antes de validar lo liberar los resultados de los pacientes, además se debe dejar un registro correspondiente en la plataforma de manejo de controles de calidad Unity Real Time.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 57 de 118
		Fecha: enero 2021

Lab.	Panel	Instrumento
955979:	Laboratorio Clínico	
27570:	Immunology Plus 31	
Y293:	CombiScreen Control	
40380:	Immunoassay Plus 3	
57370:	Therapeutic Drug M	
26470:	Assayed Chemistry	
68580:	Urine Chemistry 30-I	
54320:	Ethanol/Ammonia 31	
0183032:	VDRL Test BD 14-	
	VDRL (Titer) Aglutinació	
151059:	Control RPR 31-05	
	RPR (reagina rápida en	
1:	TBC 31-12-2030	
67640:	Cardiac Markers Plus	
120590:	VIROTROL I 30-06	

Laboratorio: 955979 Laboratorio Clínico **Lote:** 151059 Control RPR **Matriz:** Plasma
Test: RPR (reagina rápida en plasma), Aglutinación, BD Macro-Vue RPR, Reactivos Dedicados, Cualitativo, Sin Temperatura
Caduca: 31-05-2022

A = Acción **C**

	Fecha y hora	Nivel 1	S/N	Nivel 2	S/N	OP		
1	16-02-2021 14:46	No Reactivo	S	Reactivo	S	JOP	A	C
2	24-03-2021 16:17	No Reactivo	S	Reactivo	S	KT	A	C
3	25-03-2021 14:16	No Reactivo	S	Reactivo	S	JOP	A	C
4	26-03-2021 14:24	No Reactivo	S	Reactivo	S	KT	A	C
5	29-03-2021 16:41	No Reactivo	S	Reactivo	S	KT	A	C
6	31-03-2021 15:27	No Reactivo	S	Reactivo	S	KT	A	C
7	01-04-2021 14:32	No Reactivo	S	Reactivo	S	JOP	A	C
8	06-04-2021 14:53	No Reactivo	S	Reactivo	S	JOP	A	C
9	07-04-2021 15:46	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
10	08-04-2021 15:55	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
11	09-04-2021 15:22	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
12	12-04-2021 15:22	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
13	13-04-2021 15:23	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
14	14-04-2021 16:27	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
15	15-04-2021 16:35	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
16	16-04-2021 16:04	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
17	19-04-2021 16:21	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
18	20-04-2021 16:04	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
19	21-04-2021 16:05	No Reactivo	S	Reactivo	S	LGS	A	C
20	22-04-2021 15:50	No Reactivo	S	Reactivo	S	JOP	A	C
21	22-04-2021 17:04					JOP	A	C

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 58 de 118
		Fecha: enero 2021

RPR Manual

- **Equipos**

- Rotador Orbital (100 RPM x 8 minutos).
- Lámpara de Luz.

- **Reactivos**

- Antígeno de RPR (Carbón).
- Aguja de 20G.
- Controles: Reactivo, Reactivo Débil y No Reactivo
- Tarjeta RPR.
- Dispensadores de Muestra

- **Procedimiento**

1. Llevar muestras, reactivos y controles a una temperatura entre 23 y 29 °C (óptimo 25 °C).
2. Sostener un dispensador entre el pulgar y el dedo índice cerca del extremo sellado. Apriete y no suelte hasta que el extremo abierto este por debajo de la superficie de la muestra, mantener el tubo verticalmente para minimizar la agitación de los elementos celulares cuando se utiliza. Tome la muestra.
3. Sujetando en una posición vertical directamente sobre el área de prueba de la tarjeta (no tocar superficie de la tarjeta), presionar el dispensador para dejar caer una gota de suero (aproximadamente 0.05 ml). *Cada dispensador está diseñado para expulsar una cantidad en exceso de 0.05 ml, para compensar la cantidad de muestra retenida por la agitación.*
4. Invertir el dispensador, con la parte sellada esparcir la gota de suero por toda la superficie del círculo. Eliminar el dispensador. Repetir el procedimiento para el número de muestras a ensayar.
5. Agitar suavemente el frasco de antígeno antes de su uso. Sosteniendo en una posición vertical, dispensar varias gotas en la tapa del frasco dispensador para asegurar que la aguja no esté tapada. Colocar una gota "caída libre" (20G, aguja amarilla) en cada área de prueba. **NO VOLVER A MEZCLAR, LA MEZCLA DEL ANTÍGENO CON LA MUESTRA SE REALIZA DURANTE LA ROTACIÓN.** Tomar las gotas de la tapa del frasco, sacar aguja y guardar ambos.
6. Hacer girar durante 8 minutos (± 30 segundos), en agitador rotatorio a 100 ± 2 RPM. Luego de la rotación, para ayudar a diferenciar No reactivo de resultados mínimamente Reactivos, realizar una leve rotación inclinando la tarjeta con la mano (3 o 4 movimiento de vaivén). Leer inmediatamente de forma macroscópica bajo una lámpara de luz incandescente de alta intensidad o fuerte luz de día.

La suspensión del antígeno se debe mantener refrigerada entre 2 y 8 °C. Todos los demás componentes del Kit deben almacenarse en lugar seco a temperatura ambiente en el envase original.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 59 de 118
		Fecha: enero 2021

Una vez colocado en el frasco dispensador (incluido en cada juego) y refrigerado (2-8 °C), la reactividad del antígeno se mantiene satisfactoria durante tres meses aproximadamente o hasta la fecha de caducidad.

Para mantener permeables las agujas para un suministro de gotas exacto, una vez utilizadas, se retira del frasco dispensador y solo se enjuaga, con agua desionizada o destilada.

Todas las muestras que resulten Reactivas o mínimamente Reactivas se analizarán por la técnica de VDRL para su titulación.

6.1.33 PROCEDIMIENTO TÉCNICO DE VDRL EN LÁMINA PARA MUESTRAS DE SANGRE

El antígeno es una solución alcohólica incolora que contiene cardioplipina, colesterol y suficiente lecitina purificada para producir una reactividad estándar.

La solución salina amortiguada VDRL contiene formaldehído neutro, fosfato disódico, fosfato monopotásico y cloruro de sodio.

El antígeno suspendido en la solución amortiguada forma grumos cuando se combina con los anticuerpos lipoidales de suero de pacientes sífilíticos.

La técnica de VDRL permite el análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras. Se utiliza como monitor del tratamiento por ser el primer examen que baja los títulos después del tratamiento.

Un examen NO treponémico Reactivo, sin otra evidencia de sífilis, no confirma una infección por *Treponema pallidum*.

1. Preparación de la suspensión de antígeno

Al momento de preparar la suspensión de antígeno, la temperatura del laboratorio, frasco, pipetas, solución salina amortiguada VDRL y el antígeno VDRL deben estar entre 23 y 29 °C, siendo óptima 25 °C.

- Mezclar suavemente los frascos de reactivos.
- Depositar 0.4 ml de la solución salina amortiguada VDRL, con pipeta volumétrica de 1 ml en el fondo de un frasco de vidrio, redondo, de 35 mm de diámetro con tapón de vidrio esmerilado, de 30 ml de capacidad y de fondo plano para que los 0.4 ml de solución salina amortiguada se distribuyan uniformemente.
- Añadir 0.5 ml del antígeno (desde la mitad inferior de una pipeta de 1 ml graduada hasta la punta) directamente sobre la solución salina amortiguada, mientras se hace girar el frasco suave y continuamente sobre una superficie plana.
- Proseguir con la rotación del frasco por 10 segundos.
- Añadir 4,1 ml de solución salina amortiguada VDRL con pipeta de 5 ml, dejándola escurrir libremente.
- Tapar el frasco y agitar de abajo hacia arriba y viceversa, aproximadamente 30 veces en 10 segundos.
- Un volumen de 5 ml de suspensión de antígeno alcanza para 180 reacciones o más, dependiendo del número de exámenes cuantitativos que se realicen.
- Mezclar suavemente la suspensión cada vez que se use

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 60 de 118
		Fecha: enero 2021

El antígeno se añade gota a gota, pero rápidamente en 6 segundos. La punta de la pipeta debe quedar en el tercio superior del frasco y la rotación no debe ser tan vigorosa para evitar que salpique la pipeta con la solución salina amortiguada.

2. Calibración de la aguja

La aguja debe controlarse diariamente con 1 ml de suero fisiológico.

Para las reacciones cualitativas y cuantitativas en lámina con suero, la suspensión del antígeno se distribuye con una jeringa de 1 o 2 ml unida a una aguja despuntada calibre 18 que, cuando la jeringa y aguja están sostenidas verticalmente, debe dar 60 ± 2 gotas por cada ml,.

Las agujas que no satisfagan las especificaciones deberán ser reemplazadas o ajustadas.

Para despuntar la aguja se hace una muesca con una lima y se corta con alicate. Si la aguja da un número mayor de gotas que las estipuladas, la abertura de la extremidad debe agrandarse con un instrumento puntiagudo hasta lograr el número exacto. Si la aguja de un número menor de gotas, la abertura debe achicarse limando los bordes hacia adentro.

3. Análisis y mantención de la suspensión del antígeno

Se debe preparar cada día una solución fresca de antígeno, que permanecerá estable máximo por 8 horas a temperatura ambiente.

Controlar la suspensión de antígeno cada vez que se prepare, con controles comerciales (Reactivo, Reactivo débil y No Reactivo).

Las reacciones con los sueros patrones deben producir la pauta de reactividad establecida. Un suero No Reactivo debe presentar una dispersión completa de las partículas del antígeno.

No debe usarse una suspensión del antígeno inadecuada, ni tampoco mezclas de suspensiones de antígenos.

Si hay un cambio inexplicable en la reactividad de la prueba se debe verificar el pH de la solución salina amortiguada (pH 6.0) y si estuviera fuera de rango (pH 5.9 – 6.1) se debe descartar.

Los controles deben incluirse siempre en los periodos de análisis, para asegurar una reactividad adecuada de la suspensión de antígeno en el momento de realizar las reacciones.

4. Calibración del rotador

La velocidad del rotador se controla diariamente contando el número de rotaciones por minuto. Esto se realiza colocando un dedo cerca del rotador y contando el número de veces que el rotador lo toca en un tiempo determinado. Si está calibrado debe dar 180 RPM/min. El tiempo de rotación del timer del rotador debe verificarse con cronómetro y debe estar calibrado en + 15 segundos respecto al tiempo colocado

5. Preparación de las muestras

El T.M. debe separar las muestras RPR Reactivo para realizar la titulación por VDRL.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 61 de 118
		Fecha: enero 2021

Trasferir los sueros a tubos limpios, secos y descartar las muestras hemolizadas, contaminadas, quillosas o demasiado turbios.

Calentar los sueros a 56 °C por 30 minutos, el nivel de suero debe estar completamente por debajo del nivel de agua.

Sacar los tubos del baño termoregulado y examinarlos en busca de glóbulos rojos o restos visibles de partículas.

Volver a centrifugar aquellos que tienen restos de material particulado.

Los sueros deben estar a temperatura ambiente, entre 23 y 29 °C, en el momento del análisis. Para ello dejarlos 10 minutos a temperatura ambiente después de sacarlos del baño termoregulado.

Volver a calentar los sueros, otros 10 minutos a 56 °C, si se analizan después de 4 horas del primer período de calentamiento.

Los sueros se guardan refrigerados (entre 2 y 8 °C). Si el análisis se va a realizar después de 5 días de tomadas las muestras, se deben congelar a -20°C. (Evitar congelar y descongelar en forma repetida)

6.1.34 Reacción cualitativa de VDRL en lámina con suero

Depositar 50 µl de los sueros calentados dentro de un anillo de cerámica de una lámina de vidrio (previamente identificada), con micropipeta y esparcirlo por toda la superficie.

Agitar suavemente la suspensión del antígeno y añadir una gota a cada muestra con jeringa calibrada.

Agitar las láminas durante 4 minutos en rotador mecánico (180 RPM).

Inmediatamente después de la agitación leer las reacciones al microscopio con aumento 100x (10x ocular y 10x objetivo) y anotar los resultados de la siguiente forma:

LECTURA	RESULTADO
Grumos medianos y grandes	Reactivo (R)
Grumos pequeños	Reactivo débil (Rd)
Sin grumos o con ligera rugosidad	No Reactivo (NR)

Ocasionalmente, se encuentra una reacción zonal, la cual se debe a un exceso de componente **reactivo** en el suero y se reconoce por la presencia de floculación irregular y de grumos débilmente unidos. El resultado **Reactivo** se caracteriza habitualmente por grumos grandes o pequeños, pero de tamaño bastante uniforme.

La experiencia permitirá diferenciar entre este tipo de reacciones y el aspecto zonal, en el que grumos grandes y/o pequeños pueden estar entremezclados con partículas libres de antígeno. Una reacción zonal se informa como **Reactivo débil** o **No Reactivo rugoso** en la reacción cualitativa, cuando un suero es fuertemente Reactivo. En consecuencia, se recomienda que todos los sueros que den resultado Reactivo débil o No Reactivo rugoso en la reacción cualitativa, sean analizados por el procedimiento cuantitativo, antes de emitir el informe.

Cuando se obtiene un resultado Reactivo, con alguna dilución del suero que solo produjo un resultado Reactivo débil o No Reactivo rugoso con suero no diluido, se anota como Reactivo.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 62 de 118
		Fecha: enero 2021

6.1.35 Reacción cuantitativa de VDRL en lámina con suero

Analizar cuantitativamente todos los sueros que den resultado **Reactivo, Reactivo débil** o **No Reactivo rugoso** en la reacción cualitativa de VDRL en lámina. Las diluciones que se analizaran son: sin diluir (1:1), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 o más, hasta obtener un resultado No Reactivo.

Trabajar con las láminas en dirección horizontal.

- Colocar 50 µl de suero fisiológico 0.9% en los pocillos 2, 3 y 4 (R2, R4 y R8), no esparcir la solución salina.
- Agregar 50 µl de muestra en el pocillo 1 (Sin diluir) y esparcir la muestra.
- Agregar 50 µl de muestra en el pocillo 2, mezclar bien, tomar 50 µl de la mezcla del pocillo 2 y traspasar al pocillo 3, mezclar bien y traspasar 50 µl al pocillo 4, mezclar bien, tomar 50 µl y eliminar.
- Esparcir las mezclas en los pocillos.

Titulaciones -->	Sin diluir	R2	R4	R8
Muestra n°1 -->	1 1:1	1 1:2	1 1:4	1 1:8
Muestra n°2 -->	2 1:1	2 1:2	2 1:4	2 1:8
Muestra n°3 -->	3 1:1	3 1:2	3 1:4	3 1:8

- Agitar suavemente la suspensión de antígeno y manteniendo la jeringa en forma perpendicular, unida a aguja de calibre 18, añadir 1 gota a cada anillo.
- Agitar las láminas por 4 minutos en el rotador mecánico a 180 ± 2 RPM.
- Leer las reacciones al microscopio con aumento 100x inmediatamente después de la agitación.

Informar los resultados, en término de la mayor dilución del suero que dé un resultado Reactivo (no considerar resultado Reactivo débil), según los ejemplos siguientes:

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 63 de 118
		Fecha: enero 2021

Diluciones del suero						Informe
S/diluir(1:1)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
R	Rd	-	-	-	-	Reactivo sin diluir
R	R	Rd	-	-	-	R. en dilución al 1:2
R	R	R	Rd	-	-	R. en dilución al 1:4
Rd	R	R	R	Rd	-	R. en dilución al 1:8
NR(rugoso)	Rd	R	R	R	-	R. en dilución al 1:16
Rd	-	-	-	-	-	Reactivo débil
R	R	-	-	-	-	R. en dilución al 1:2

R=Reactivo Rd=Reactivo débil NR=No Reactivo

LAVADO DE MATERIAL

Láminas

A medida que se van leyendo las láminas se van depositando en un recipiente que contiene hipoclorito de sodio (0.5-1%) para descontaminar.

Se enjuagan con agua destilada y luego se ponen en acetona para desengrasar y se frotran con un paño suave para que no queden con aureolas.

Tubos

Descontaminar los tubos con hipoclorito de sodio al 0.5-1%

Lavarlos con detergente neutro, escobillándolos uno por uno con hisopo.

Enjuagarlos con agua corriente y con agua destilada.

Secar los tubos para suero en horno a 120 °C durante 30 minutos.

Frascos para preparar la suspensión de antígeno

Eliminar la suspensión de antígeno sobrante

Se le agrega detergente neutro y se escobilla con un hisopo

Se enjuaga con agua corriente y luego agua destilada.

Se enjuaga con alcohol y enseguida con acetona para desengrasarlo

Se seca en horno a 120 °C durante 30 minutos.

Jeringas y agujas

Se lavan con agua de la llave, con alcohol y acetona.

Se separa la aguja de la jeringa después de varias lavadas.

Se separa el embolo de la jeringa.

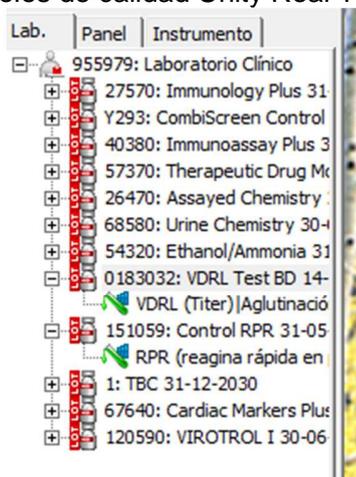
Se secan al aire.

Control de calidad

Los controles de calidad se deben procesar cada vez que se realicen las técnicas correspondientes, siempre se deben cumplir, en el caso de un no cumplimiento se deben analizar las causas correspondientes y buscar una solución antes de validar lo liberar los

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 64 de 118
		Fecha: enero 2021

resultados de los pacientes, además se debe dejar un registro correspondiente en la plataforma de manejo de controles de calidad Unity Real Time.



Laboratorio: 955979 Laboratorio Clínico		Lote: 0183032 VDRL Test BD		Matriz: Serumen						
Test: VDRL (Titer), Aglutinación, Atlas Medical VDRL Antigen Test, Reactivos Dedicados, Cualitativo, Sin Temperatura										
Caduca: 14-10-2021										
Guardar		Establecer fecha		Ver respuesta esperada						
				A = Acción C = Comentario:						
	Fecha y hora	Nivel 1	S/N	Nivel 2	S/N	Nivel 3	S/N	OP	A	C
1	18-02-2021 12:12	No Reactivo	S	Reactivo Débil	S	Reactivo 1/8	S	JOP	A	C
2	25-03-2021 14:16	No Reactivo	S	Reactivo Débil	S	Reactivo 1/4	S	JOP	A	C
3	01-04-2021 14:32	No Reactivo	S	Reactivo Débil	S	Reactivo 1/4	S	JOP	A	C
4	08-04-2021 15:56	No Reactivo	S	Reactivo 1/2	S	Reactivo 1/8	S	LGS	A	C
5	15-04-2021 16:35	No Reactivo	S	Reactivo Débil	S	Reactivo 1/4	S	LGS	A	C
6	22-04-2021 12:00	No Reactivo	S	Reactivo Débil	S	Reactivo 1/4	S	JOP	A	C
7	22-04-2021 17:03							JOP	A	C

6.1.36 Examen de Microaglutinación para anticuerpos contra *Treponema pallidum* (MHA-TP)

Para realizar esta técnica existen diversos kits con procedimientos de ejecución distintos.

En este caso, se mostrara técnica Syphagen TPHA.

Se requieren placas de microhemaglutinación con fondo en U (redondo).

Los hematíes de pollo estabilizados se sensibilizan con un extracto antigénico de *Treponema pallidum*, los cuales aglutinarán con los anticuerpos específicos contenidos en el suero o plasma de pacientes sífilíticos.

Las reacciones no específicas se detectan con el reactivo control no sensibilizado.

Los anticuerpos del grupo treponema no específicos de la sífilis se absorben con un extracto de treponema Reiter en la solución diluyente

Los reactivos permanecerán inalterados hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se almacenan entre 2 y 8 °C.

PROCEDIMIENTO

Test cualitativo

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 65 de 118
		Fecha: enero 2021

Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente.

Asegurarse de que el reactivo antigénico y el reactivo control estén bien resuspendidos.

Para cada test se necesitan 4 pocillos, 2 de los cuales se utilizarán para la preparación de la dilución de la muestra. Ver tabla 1.

- Distribuir 25 µl de diluyente en el pocillo 1, 100 µl en el pocillo 2 y 25 µl en los pocillos 3 y 4.
 - Añadir 25 µl de la muestra en el pocillo 1. Mezclar el contenido del pocillo 1 y transferir 25 µl al pocillo 2.
- Mezclar y transferir 25 µl del pocillo 2 al 3, mezclar y desechar 25 µl del pocillo 3. Transferir otros 25 µl del pocillo 2 al 4, mezclar y desechar 15 µl del pocillo 4
- Añadir 75 µl de reactivo control al pocillo 3 y 75 µl de reactivo antigénico al pocillo 4.
 - Mezclar el contenido de los pocillos dando unos ligeros golpes en los lados de la placa o utilizar un agitador de placas por al menos 30 segundos
 - Cubrir la placa e incubar durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Evitar cualquier movimiento de la placa y mantener lejos de cualquier fuente de calor.
 - Se deben incluir los controles positivo y negativo en cada serie de muestras teniendo en cuenta que los controles ya están prediluidos 1:20. Añadir 25 µl de cada control directamente en los pocillos 3 y 4. No añadir solución diluyente.

Well no.	1	2	3 Control	4 Test
Diluent solution µl	25	100	25	25
Sample µl	25			
Mix and Transfer µl		25 →	25 →	25 →
Sample dilution	1:2	1:10	1:20	1:20
Control reagent µl	-	-	75	-
Antigen reagent µl	-	-	-	75
Final dilution			1:80	1:80
INCUBATE FOR 45-60 MINUTES AT ROOM TEMPERATURE				

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 66 de 118
		Fecha: enero 2021

Interpretación de resultados

El control negativo debe dar un resultado negativo.

El control positivo debe dar un resultado positivo en el ensayo.

Lectura de los resultados

-  4+ : Tapiz homogéneo de células aglutinadas que cubre el fondo del pocillo, a veces con bordes irregulares.
 -  3+ : Tapiz homogéneo de células aglutinadas que cubre parcialmente el fondo del pocillo.
 -  2+ : Tapiz homogéneo de células aglutinadas rodeado por un anillo de hematies.
 -  1+ : Tapiz homogéneo de células aglutinadas rodeado por un patente anillo de hematies.
 -  ± : Botón de hematies con una pequeña abertura central.
 -  - : Botón de hematies con una muy pequeña abertura central o botón totalmente compacto.
- Positivo : desde 4+ a 1+
Dudoso : ±
Negativo : -

NOTA: Cualquier aglutinación observada en el pocillo del reactivo control (pocillo 3) indica la presencia de aglutininas no específicas. Aunque las reacciones inespecíficas son poco frecuentes cuando se utilizan hematies de pollo, una muestra con este tipo de reacción no puede interpretarse con este kit.

6.1.37 PROCEDIMIENTO TÉCNICO PARA ESTUDIO DE BACILO DE KOCH

6.1.38 Consideraciones Generales

a) Recepción y registro de las muestras

Las muestras serán recibidas por TP en la recepción del Laboratorio y guardadas transitoriamente en un contenedor con unidades refrigerantes. En esta etapa del proceso solo se realizará control de la orden, ya que las muestras vienen en sistema de triple embalaje, por lo que no se pueden cotejar.

Una vez que las muestras son trasladadas a la sección de Koch por la TP, se realiza el registro y revisión dentro del gabinete de bioseguridad. Se cotejan los datos de la orden con la muestra correspondiente, revisa que los datos en la orden estén completos y las condiciones de la muestra para evaluar su posible rechazo.

b) Condiciones de rechazo de muestras:

Consideración general: la política de la Sección de TBC, en relación a rechazo es el No Rechazo, sin embargo, hay situaciones excepcionales en que necesariamente debe procederse al rechazo de la muestra.

1. Volcamiento de la muestra, dentro de la bolsa y/o papel que cubre al pomo.
2. Muestras con evidentes signos de descomposición (hongos).
3. No concordancia entre los datos de la solicitud de análisis y datos de la muestra

NOTA: al rechazar una muestra, informar al Establecimiento y/o Sector de procedencia, indicando claramente el motivo del rechazo. Ingresar en sistema Bioslis y solicitar una nueva muestra.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 67 de 118
		Fecha: enero 2021

c) Registro de muestras

Las solicitudes de exámenes serán registradas en un libro de registro que contiene en columnas los datos aportados por la solicitud. Este debe contener todos los datos requeridos:

1. Fecha de recepción.
2. Identificación del paciente: nombre y dos apellidos, Rut y procedencia.
3. Tipo de muestra: expectoración, lavado bronquial, orina, otras.
4. Antecedentes de tratamiento: virgen a tratamiento, antes tratado, control del tratamiento (mes de tratamiento).

Además se registraran datos propios del laboratorio:

1. Calidad de la muestra: Si es expectoración: muestra purulenta (P), muestra mucosa (M) muestra saliva (S).
2. Numeración de la Baciloscopia y cultivo, con el espacio para ingresar los resultados.

Registrar esta clasificación en la Orden del examen, además del número de muestras, el número de Baciloscopia y número de cultivo.

Numerar la muestra y la Orden del examen con plumón negro permanente.

Ubicar las muestras ya numeradas ordenadamente dentro de la caja de uso interno, anotando la fecha en la caja, la cual será refrigerada hasta el procesamiento de las muestras.

d) Procesamiento de muestra de acuerdo a orden:

El tipo de examen a realizar se realizará de acuerdo al tipo de paciente siguiendo este criterio (de acuerdo a normativa actualizada):

- PCR GeneXpert MTB7Rif; a todas las muestras de pesquisa.
- Baciloscopia: controles tratamiento, paciente VIH, mayores de 80 años, paciente con fibrosis quística.
- Cultivo líquido: controles tratamiento, paciente VIH, contactos, menores de 15 años, muestras extrapulmonares y a todas las muestras con prueba molecular positiva, incluyendo trazas.

6.1.39 Preparación de los extendidos y tinción de Baciloscopías

Para la preparación de los extendidos, la tinción de Ziehl-Neelsen y Tinción de fluorescencia se requieren los siguientes implementos:

MATERIALES:

- Delantal desechable con mangas
- Guantes
- Mascarilla N95
- Mascarilla de vapores orgánicos
- Papel absorbente

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 68 de 118
		Fecha: enero 2021

- Caja de desechos cortopunzantes
- Portaobjetos nuevos esmerilados y numerados correlativamente
- Tubos de centrifuga de 50 ml estériles
- Bolsas autoclavables
- Pipetas plásticas estériles desechables
- Reactivos: fucsina fenicada, solución decolorante, azul de metileno, auramina y permanganato de potasio.

La técnica será realizada dentro del gabinete de bioseguridad. Previo a la realización de la técnica, colocar dentro del gabinete de bioseguridad:

- Papel absorbente cubriendo la superficie interior del gabinete
- Caja de desechos cortopunzantes.
- Caja con portaobjetos esmerilados numerados y una caja con portaobjetos no esmerilados.

6.1.40 Preparación de los extendidos (Una vez encendido el gabinete y el extractor de aire funcionando)

a) Muestras de expectoración:

- Seleccionar la muestra por numeración correlativa y colocar el pomo sobre papel absorbente, abrir, elegir la porción más purulenta de la muestra y ponerla sobre el portaobjetos esmerilado nuevo, ya enumerado.
- Con un segundo portaobjetos no esmerilado se presiona la muestra extendiéndola por medio de un batido suave, hasta obtener una película homogénea en la parte central del portaobjetos y el segundo portaobjetos utilizado es eliminado en la caja de desechos cortopunzantes. Si la muestra es líquida se hará un concentrado sobre el portaobjeto.
- Al terminar este proceso, aproximadamente 1 ml de la muestra será puesta en un tubo de 50 ml estéril para el posterior cultivo.

b) Muestras líquidas:

- Toda muestra extrapulmonar (orina, lavado bronquial, líquido pleural, etc.) se debe centrifugar en dos tubos estériles a 4400 RPM durante 20 minutos, en el caso de las orinas centrifugar idealmente 50 ml, si se trata de otra muestra, centrifugar el volumen total.
- Eliminar el sobrenadante en el receptáculo inicial. Resuspender el pellet en aproximadamente 1-2 ml de sobrenadante. Colocar 1 o 2 gotas del sedimento, con pipeta estéril desechable sobre un portaobjetos nuevo previamente numerado y eliminar los desechos en bolsa autoclavable.
- Toda muestra extrapulmonar deberá dejar secar por al menos 24 horas, dentro del gabinete, antes de la tinción.

c) Muestras de tejido:

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 69 de 118
		Fecha: enero 2021

- Colocar en mortero estéril el trozo de tejido y hacer cortes con bisturí estéril, macerar en mortero agregando agua destilada estéril o suero fisiológico gota a gota.
- Agregar una pequeña cantidad de agua destilada estéril o suero fisiológico estéril. Colocar 1 o 2 gotas del líquido con una pipeta estéril sobre un portaobjetos esmerilado nuevo ya identificado. Eliminar los desechos en bolsa autoclavable.
- Todas muestra extrapulmonar debe ser procesada idealmente hasta 4 horas desde su obtención.
- Para dejar secar las láminas, éstas se dejarán dentro del gabinete de bioseguridad hasta el momento de su tinción.

6.1.41 Tinción de los extendidos: Tinción de Ziehl Neelsen

Colocar los portaobjetos con los extendidos bien fijados en una bandeja, especializada para realizar tinciones, uno al lado del otro dejando un espacio de al menos 0,5 cm entre láminas

1. Coloración específica: tinción de fucsina

Cubrir con fucsina el extendido, con un hisopo impregnado en alcohol ácido y encendido, se calienta por debajo de la lámina hasta la emisión de vapores blancos. Retirar el hisopo y repetir la misma operación dos veces más, cuidando que el colorante no se derrame, no se seque y no hierva. Si esto sucediera se debe agregar más colorante. Tiempo total de contacto: 5 minutos.

Lavar suavemente con agua corriente fría.

2. Decoloración

Decolorar con alcohol ácido las veces que sea necesario hasta que las partes menos espesas queden incoloras y las más gruesas queden con un leve tinte rosado. La decoloración se alterna con lavado suave con agua corriente fría. Tiempo total de contacto: 3 minutos.

3. Contra-coloración: Azul de metileno

Cubrir los extendidos con azul de metileno por 1 minuto. Lavar con agua corriente fría suavemente. Tiempo total de contacto: 1 minuto.

Al término de esta etapa de tinción eliminar los guantes como desecho común, la mascarilla de vapores orgánicos será reutilizada durante 6 meses, mientras que los filtros solo duran 50 horas. Quitarse el delantal desechable y eliminar.

6.1.42 Tinción de Auramina

1. Coloración

Cubrir con auramina el extendido por 20 minutos. Después de este tiempo se lava con agua corriente.

2. Decoloración: alcohol ácido 0.5%

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 70 de 118
		Fecha: enero 2021

Decolorar con alcohol ácido al 0,5% por 2 minutos. Lavar con agua corriente, si la muestra aún continúa con tonalidad amarilla, agregar decolorante por un minuto más y volver a lavar con agua corriente.

3. Contra-coloración: Permanganato de potasio

Cubrir los extendidos por 1 minuto con permanganato de potasio, luego lavar con agua corriente.

Debido a que esta tinción no emite vapores tóxicos, no se requiere de uso de mascarilla de vapores orgánicos, solo guantes y pechera como medida de bioseguridad.

6.1.43 Lectura de Baciloscopías

a) Lectura fluorescencia (Auramina)

La observación microscópica se hace con objetivo de 40x, con el módulo LUMIN de fluorescencia LED. Este módulo solo se debe enchufar y abrir el paso de luz con la perilla que tiene a su lado derecho. La lectura se realiza recorriendo el frotis a lo largo desde un extremo al otro. Mínimo se deben leer 40 campos para dar la muestra como negativa. En caso que la muestra sea positiva, se debe reteñir el frotis con tinción de Ziehl Neelsen para la lectura semi-cuantitativa.

Con esta tinción los BAAR se ven en forma de bastones, delgados y amarillos, ligeramente curvos, pueden encontrarse solos o en grupos.

b) Lectura Ziehl Neelsen

La observación microscópica se hace con objetivo de inmersión (100x) y máximo de luz. La lectura debe hacerse de manera sistemática y estandarizada, comenzando en uno de los extremos y recorriendo longitudinalmente toda la preparación con un movimiento en zigzag, hasta leer un mínimo de 100 campos útiles, aquellos en que se encuentran elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células). Los campos en que no aparezcan dichos elementos no deben contabilizarse en la lectura.

Cuando no se encuentren BAAR, en 100 campos, se debe hacer una nueva búsqueda más cuidadosa en otros 100 campos.

Los BAAR se observan como bastoncitos delgados y rojos, ligeramente curvos, más o menos granulados, aislados, pareados o en grupos, destacándose claramente contra el fondo azul. Calcular el número de bacilos vistos por campo.

Al cambiar la lámina se debe limpiar el aceite adherido al lente de inmersión, especialmente si ésta ha sido positiva, con papel seco y suave.

Pauta de informe semi-cuantitativo:

RESULTADO NEGATIVO
No se observan BAAR, en 100 campos observados
1 – 3 BAAR, en 100 campos observados.

Cuando solo se encuentra 1 – 3 BAAR en los 100 campos, extender la lectura a 200 campos. Si no se encuentran más bacilos, hacer otro extendido de la misma muestra. Si no se encuentran otros bacilos, informar muestra como: No se observan BAAR y se solicita nueva muestra para confirmación.

RESULTADO POSITIVO

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 71 de 118
		Fecha: enero 2021

BAAR (+)	< 1 BAAR promedio por campo, en 100 campos observados
BAAR (++)	Uno a diez BAAR promedio por campo, en 50 campos observados
BAAR (+++)	> 10 BAAR promedio por campo, en 20 campos observados

En caso de un resultado positivo, este se informa a la brevedad vía correo electrónico y si es posible por teléfono a los encargados del programa de TBC involucrados, dentro de la brevedad posible desde detectado el resultado.

6.1.44 Procedimiento para la Técnica de Cultivo del Bacilo de Koch

a) Materiales, equipamiento y reactivos

Materiales y equipamiento:

- Delantal desechable con mangas
- Guantes quirúrgicos
- Mascarilla desechable N95
- Papel absorbente
- Caja para desechos cortopunzantes
- Pipetas plásticas desechables estériles
- Tubos de centrifuga de 50 ml estériles
- Tubos con medio de cultivo Lowenstein-Jensen
- Tubo indicador (MGIT)
- PANTA
- Cámara de cultivo
- Equipo MGIT 960
- Vórtex
- Baño maría con agitador

Reactivos:

- Hidróxido de Sodio al 2%
- Hidróxido de Sodio al 3.5%
- Ácido Sulfúrico 7% (tornasol)
- Papel indicador de pH 6.4 – 8.0

Previo a la realización de la técnica, colocar dentro del gabinete de bioseguridad:

1. Papel absorbente cubriendo la superficie interior del gabinete.
2. Bolsa autoclavable.
3. Papel pH.
4. Tubos de centrifuga, fondo cónico estériles desechables de 50 ml.
5. Medios rotulados.
6. Vórtex.
7. Pipetas estériles desechables.

Pasos previos: en la preparación de los extendidos se dispuso aproximadamente 1 ml de la muestra de cada paciente en un tubo de centrifuga rotulado, enumerar los tubos.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 72 de 118
		Fecha: enero 2021

b) **Descontaminación**

Este procedimiento comienza con la muestra en el tubo cónico

1. A cada tubo se le agrega NaOH 3,5% en igual cantidad que la muestra y vortear.
2. Se llevan los tubos al baño maría con agitador a 37 °C durante 20 minutos.
3. Cumplidos los 20 minutos, se trasladan al gabinete de bioseguridad para el proceso de neutralización.

c) **Neutralización**

Una vez que se tienen las gradillas con muestras dentro del gabinete:

1. A cada tubo agregar, gota a gota ácido sulfúrico al 7% (que contiene indicador), hasta que se produzca viraje de color desde incoloro hasta un rosado leve.
2. Vortear y medir pH que debe estar entre 6,6 y 7,2. Si no se logra llegar a este pH proceder de la siguiente forma
3. Agregar gota a gota NaOH al 2% hasta el viraje del color a celeste suave (pH ácido)
4. Vortear y medir pH (6,6-7,2)

El pH se mide muestreando con una pipeta estéril sobre el papel indicador, cada vez que se agrega reactivo. Este punto es de suma importancia y no se debe realizar solo visualmente. En este paso se debe tener mucho cuidado de no diluir la muestra, no se debe repetir el ajuste de pH más de 3 veces.

NOTA: este procedimiento se realiza con cada cultivo, nunca en lotes. No se debe trabajar con más de 10 – 12 muestras simultáneamente, ya que la carga bacilar comienza a disminuir a los 30 minutos desde que se agrega el NaOH 3,5%.

6.1.45 Siembra cultivos sólidos

1. Sembrar 0,3 a 0,5 ml (5 – 6 gotas) de muestra ya tratada en cada tubo de medio Lowenstein-Jensen numerados.
2. Dejar en gradilla la tanda procesada con la tapa semicerrada y luego disponer en posición inclinada de manera que la siembra bañe la superficie del medio.
3. Poner los tubos sólidos en las bandejas de la cámara de cultivo de forma ordenada.
4. Ordenar material usado, desechar papel del gabinete y realizar una limpieza con hipoclorito de sodio al 0,5% y luego alcohol al 70°.
5. Dejar la bolsa autoclavable dentro de la caja de traslado a la sala de autoclave para su esterilización y posterior eliminación.
6. Lavado de manos.

Incubación

Los tubos se incuban por 60 días en la cámara de cultivo a 36 °C +-1.

Revisión de los cultivos

La primera observación se realiza a las 48-72 horas, para cerrar los tubos después de que se haya evaporado. Además, se revisa para detectar contaminación temprana asociada a

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 73 de 118
		Fecha: enero 2021

la flora, el tubo se elimina y se registra en el libro la contaminación y posteriormente en el sistema informático.

La segunda revisión se hace a los 30 días, fecha en que se informa todo lo positivo y la contaminación tardía.

A los 60 días se hace la última revisión y el informe definitivo, ya sea positivo o negativo.

6.1.46 Siembra cultivo líquido

Paso previo; descontaminación y ajuste de pH.

1. Etiquetar los tubos con los códigos de barra que identifican la muestra.
2. Agregar 800 ul de caldo complementario para cultivo de Koch líquido a cada muestra. Este debe prepararse con anticipación, dejar a temperatura ambiente previamente (10 minutos), al frasco con liofilizado (PANTA) se le debe agregar los 15 ml del frasco líquido con suplemento de crecimiento, se agita por rotación y se deja reposar por 10 minutos o hasta que se disuelva completamente.
3. Agregar 500 ul de muestra al tubo de caldo enriquecido para cultivo de Koch líquido, al que previamente se le agregó el suplemento.
4. Mezclar suavemente por inversión 2 veces.
5. Ingresar al equipo "Bactec MGIT 960". Para ingresar al equipo, se debe abrir la puerta y presionar el botón para añadir muestras (el primero de la pantalla de izquierda a derecha), al presionarlo se activará el lector de códigos. Se debe escanear dos códigos, primero el código del tubo y luego el código de identificación del paciente. Luego el equipo indica la posición en que se debe colocar el tubo prendiendo una luz verde que parpadea, se introduce el tubo y se cierra la puerta.

El cultivo líquido se incuba por 42 días. Al pasar los 42 días de incubación o en caso de un cultivo positivo, el equipo da una alarma de luz, verde en caso de que estén negativos y rojo si están positivos. Para retirarlos se debe presionar el botón (rojo o verde) y se encenderán las luces en las posiciones que correspondan retirar, se levanta y se escanean. En caso que se retire un cultivo con alarma positiva del equipo, se le debe hacer un frotis y teñir con Ziehl Neelsen. Si se ven BAAR se debe enviar al ISP y notificar al paciente, en el caso que no haya alguna otra prueba positiva.

6.1.47 INFORME SEMICUANTITATIVO

El informe se hace en base a la suma de todos los recuentos de las colonias encontradas en la totalidad de los tubos sembrados. Las colonias típicas de *Mycobacterium tuberculosis* variedad humana son secas, rugosas y con una leve coloración marfil.

DE 1 A 50 COLONIAS	Se informa el número exacto de colonias desarrolladas
MÁS DE 50 COLONIAS	Colonias no confluentes
INCONTABLES COLONIAS	Colonias confluentes
AUSENCIA DE COLONIAS	Se informa: Cultivo negativo
CONTAMINADOS TODOS LOS TUBOS	Se informa: muestra contaminada, enviar nueva muestra

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 74 de 118
		Fecha: enero 2021

COLONIAS ANORMALES EN MORFOLOGIA O PIGMENTACION	Se envía la colonia sospechosa al ISP para confirmación y tipificación. Se avisa vía web a los encargados del programa y se espera los resultados del ISP para el informe final.
---	--

6.1.48 PCR XPERT MTB/RIF Ultra

Materiales

- Cartucho Xpert
- Reactivo muestra
- Pipetas estériles
- Vortex
- Tubo cónico de 15 ml
- Equipo GeneXpert

Procedimiento para PCR MTB/RIF

Una vez numerada la muestra se debe depositar en un tubo cónico de 15 ml, luego agregar el doble de volumen de la muestra de reactivo muestra, vortear por 10 segundos y dejar incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Volver a vortear y dejar incubar por 5 minutos más. En caso de ser necesario, se puede vortear y dejar 5 minutos más si la muestra no está completamente disuelta.

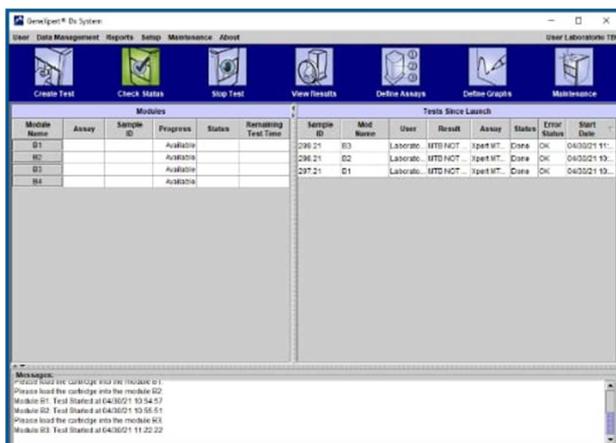
Enumerar el cartucho Xpert, abrir el cartucho y agregar suavemente 2 ml de la muestra completamente disuelta en la cámara para muestra, se debe tener cuidado de no formar burbujas, finalmente cerrar e ingresar en el equipo GeneXpert.

Uso equipo GeneXpert

Se debe prender primero el equipo con un interruptor que se encuentra en la parte posterior y luego el computador. Una vez encendido pedirá una clave de acceso **cphd**, se ingresa la clave y se debe esperar que se inicie el programa Xpert, nuevamente pedirá una clave **labtbc**.

El programa está en inglés y no se debe cambiar, no funciona correctamente en otro idioma. Para ingresar una muestra se debe acceder al módulo crear prueba (create test), se abrirá una pantalla que no pide ingresar el nombre del paciente, luego una ventana que nos pide el número de la prueba y finalmente nos pide escanear el código de barra del cartucho y nos asignará un módulo, que se indicará en la pantalla y en el equipo se encenderá una luz. Se pone el cartucho en el módulo correspondiente y en la pantalla iniciamos la prueba (start test), solicitará una clave **labtbc** y se cierra el módulo que corresponde. Finalizada la prueba, se pueden ver los resultados en el módulo de resultados (view results), se puede ver el resultado de la prueba de presencia de MTB, resistencia a rifampicina y la causa del error, en caso que la prueba no haya finalizado correctamente.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 75 de 118
		Fecha: enero 2021



6.2 PROTOCOLO DE CONTROL DE CALIDAD

El objetivo de este protocolo es implementar y sistematizar un Sistema de Control de Calidad Interno (CCI), cuyo propósito es evaluar el desempeño del sistema de medición para liberar los resultados de las muestras de pacientes procesadas bajo las mismas condiciones de trabajo. Permiten detectar desvíos y variabilidad del sistema analítico, para tomar acciones preventivas y apoyar en la mejora del desempeño.

Los controles se deben pasar al inicio de las actividades de la jornada o cuando corresponda según los criterios de control de calidad aplicados.

6.2.1 Selección de material control

El laboratorio debe seleccionar el material de control basado en las siguientes premisas o sugerencias:

- Que se asemejen lo más posible a muestras de pacientes en cuanto a su reactividad con el sistema de medición utilizado.
- Se pueden elegir de primera opinión (fabricante) y/o tercera opinión (independiente), siendo los últimos más recomendables como alternativa.
- El material de control se debería escoger considerando su estabilidad, disponibilidad en cantidad suficiente para mantener un análisis a través del tiempo, idealmente por al menos 6 meses, o por el tiempo que sea posible de acuerdo a la estabilidad del material, se sugiere el uso de controles de tercera opinión, de matriz similar a las muestras en estudio e incluirlos en una corrida analítica, es recomendable utilizar material(es) de control trazable(s).
- El nivel de concentración del control, en lo posible debe estar comprendido en el intervalo de referencia biológico normal y bajo o sobre éste y/o próximos a los límites de decisión médica.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 76 de 118
		Fecha: enero 2021

6.3 PROCEDIMIENTO PARA CONTROL DE CALIDAD PARA MEDICIONES CUALITATIVAS ASOCIADAS AL LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA

El Control de Calidad (CC) en un laboratorio de microbiología clínica comprende el monitoreo de: Medios de cultivo, reactivos e instrumentos. Todo esto permite asegurar una correcta ejecución del aislamiento, identificación y caracterización de los microorganismos patógenos presentes en una muestra y realizar pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos para orientar la terapia

Lo importante es contar con controles de calidad internos (como los descritos en este protocolo) y externos (correspondientes al envío de cepas PEEC, del ISP), que permitan monitorizar de manera continua las actividades del laboratorio de microbiología en todas sus etapas para lograr un proceso de mejora constante de la calidad, permitiendo alertar a los profesionales responsables de posibles resultados insatisfactorios que pueden y deben ser corregidos.

Se debe mantener un registro de funcionamiento y uso de los instrumentos, revisión de informes de resultados y sobretodo la motivación y promoción de la capacitación permanente.

Materiales, reactivos y equipos

MATERIALES:

- Mechero Bunsen
- Tórulas estériles
- Asas estériles
- Medios de cultivo enriquecidos, selectivos y diferenciales
- Cepas ATCC

REACTIVOS:

- KIT DE TINCIÓN DE Gram
- Oxidasa
- Agua oxigenada
- Sensidiscos
- Tiras de E-TEST
- Látex de reacción: Staphylococcus aureus, Streptococcus spp.

EQUIPOS:

- Estufa de cultivo a 35-37 °C
- Congelador (-20 °C)
- BD Phoenix M 50
- Refrigerador

Metodología de Conservación y siembra de las cepas de control de calidad (ATCC):

- Las cepas del control de calidad deben ser probadas con el procedimiento estándar del método de difusión en disco o por el método automatizado, utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizan para las cepas clínicas. Para su siembra a partir del liofilizado comercial dirigirse al inserto del proveedor.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 77 de 118
		Fecha: enero 2021

- Para conservar las cepas por tiempos prolongados es conveniente colocarlas en congeladores a temperaturas menores a -20 °C (idealmente a -70°C), utilizando caldo soya tripticasa con 20% de glicerol
- Las cepas para el trabajo diario deben conservarse entre 2-8 °C, sembrando en estrías en agar sangre de cordero al 5% (bacterias comunes) o en agar chocolate (bacterias exigentes) y deberán ser traspasadas semanalmente. Los cultivos de trabajo deben ser remplazados por lo menos una vez al mes, a partir de la cepa que se mantiene congelada.
- Las cepas para controlar los antibiogramas (automatizado o por difusión): Antes de ser probada las cepas se deben subcultivar en un medio sólido con el fin de obtener colonias aisladas. Los aislamientos a partir de congelados o liofilizados se deben traspasar dos veces antes de ser usados.

6.3.1 Control de calidad de Antibiograma

a) Control de calidad del antibiograma automatizado (BD Phoenix100)

Requisitos de calidad: Las cepas ATCC a probar deben dar dentro de los rangos de CIM establecidos por la CLSI e incorporados en el programa EpiCenter.

- El primer paso es proceder a recuperar y preparar las cepas ATCC para ser utilizadas según “conservación y siembra de las cepas de control de calidad”
- Realizar a cargar los paneles del Phoenix 100 según el procedimiento indicado en el punto 11, preparación del caldo y el panel del método automatizado

Panel	Cepas ATCC a probar	Periodicidad
UNMIC-407	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>Ps. Aeruginosa</i> ATCC 27853	
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	
UNMIC/ID-407	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>Ps. Aeruginosa</i> ATCC 27853	
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	

UNMIC/ID-406	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>Ps. Aeruginosa</i> ATCC 27853	
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	
PMIC/ID-89	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Mensual
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	
	<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	

Uso de calibradores: no aplica

b) Control de calidad de antibiograma por difusión Kirby-Bauer:

Requisitos de calidad: Las cepas ATCC a probar deben darse dentro de los rangos establecidos por la CLSI, midiendo para tal efecto los halos en milímetros.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 78 de 118
		Fecha: enero 2021

Realizar control de:

- Medio de Cultivo
 - PH del Medio
 - Altura de las placas
 - Antimicrobiano (sensidiscos)
 - Tiras de E-TEST
 - Número de sensidiscos por placa
 - Humedad
 - Temperatura de incubación
- El primer paso es proceder a recuperar y preparar las cepas ATCC para ser utilizadas según "conservación y siembra de las cepas de control de calidad"
 - Luego se procede a inocular las placas según el procedimiento indicado en el punto 10.1 "Antibiograma por difusión en Agar (Técnica de Kirby-Bauer)
 - Los rangos establecidos se encuentran en las tablas respectivas para cada bacteria y para cada antibiótico. Ver punto 12 "Antibióticos usados para estudios de susceptibilidad (CLSI 2015) o en las tablas 4A del documento M100 del CLSI.
 - Registrar resultados (ANEXO 1)

En la siguiente tabla se detallan las cepas a probar para el método por difusión Kirby-Bauer y su periodicidad:

Cepas ATCC a probar	Antimicrobianos	Periodicidad
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Control de Antimicrobianos para enterobacterias	Mensual
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Control de Antimicrobianos para BNF y detección del nivel de cationes calcio, magnesio y PH del medio, para probar aminoglucósidos	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Control positivo para producción de BLEE	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Control de Antimicrobianos para <i>Staphylococcus spp.</i> y <i>Enterococcus spp.</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Control de niveles adecuados de timina/timidina en Agar Mueller Hinton, uso de sulfonamidas	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Control de Antimicrobianos para <i>Streptococcus spp.</i>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Control de Antimicrobianos con inhibidores de β Lactamasa	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BA 977	Control positivo de resistencia inducible a Clindamicina	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	Control de resistencia a Vancomicina	

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 79 de 118
		Fecha: enero 2021

c) **Acciones correctivas en resultados fuera de rango en los antibiogramas y pruebas:**

- Probar la combinación droga-bacteria involucrada desde el día en que se detecta el error y observar cinco días consecutivos. Registrar todos los resultados.
- Si las cinco medidas para la combinación droga-bacteria están dentro de los rangos aceptables no es necesario otra acción correctiva.
- Si alguna de las cinco medidas permanece fuera del rango aceptable, se requiere revisar las siguientes acciones:
 - Revisar si la cepa control es la correcta.
 - Observar si existe contaminación de la cepa o el medio
 - Las zonas de diámetro fueron medidas y transcritas correctamente
 - El estándar de turbidez no esté vencido y haya sido correctamente homogenizado antes de su uso.
 - Los materiales usados no estuvieran vencidos y que fueran almacenados a la temperatura correcta.
 - La estufa de incubación tuviera la temperatura y atmósfera adecuada.
 - Funcionamiento correcto de los equipos utilizados
 - Conservación adecuada de los discos, paneles, medios, pruebas, etc.
 - Las cepas control no han sido cambiadas ni contaminadas
 - Las suspensiones del inóculo se han preparado y ajustado correctamente y a partir de una placa incubada por no más de 24 horas.
 - En los antibiogramas por difusión comprobar el grosor del medio Mueller Hinton, el que debe ser de 4mm. (a menor profundidad falsa sensibilidad, y a mayor profundidad falsa resistencia).
 - Puede ser necesario obtener una nueva cepa de control y nuevos lotes de materiales. Hasta que el problema sea resuelto, puede ser necesario utilizar un método alternativo para evaluar la sensibilidad.
 - Una vez que el problema haya sido corregido, se debe documentar el comportamiento satisfactorio de las pruebas.

Uso de calibradores: no aplica

6.3.2 Control de calidad de los medios de cultivo:

Requisitos de calidad:

- Ausencia o presencia de desarrollo bacteriano según cada medio de cultivo a probar.
- Una vez preparados los medios de cultivo se probarán sembrando en ellos distintas cepas según el medio. Las cepas a probar se encuentran congeladas, por lo tanto se deben descongelar previamente y traspasar a un agar Sangre, Mc Conkey según corresponda.
- Los resultados se anotan en las tablas contenidas en anexos, en las cuales aparece detallado los resultados esperados según cada medio de cultivo.
- Registrar resultados (ANEXO 2)

En la siguiente tabla se detallan las cepas a probar y su periodicidad:

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 80 de 118
		Fecha: enero 2021

Medios de Cultivo	Cepas a probar	Periodicidad
Agar Sangre de cordero 5%	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	mensual
	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	
Agar Mc Conkey	<i>E. coli</i> ATCC 25922	mensual
	<i>Proteus mirabilis</i>	
Agar Cromogénico ITU	<i>E. coli</i> ATCC 25922	mensual
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	

Agar SS	<i>Salmonella spp.</i>	mensual
	<i>Shigella spp</i>	
Agar Mc Conkey-Sorbitol	<i>E. coli</i> O:157	mensual
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	
DNAsa	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	mensual
	<i>S. epidermidis</i>	
CHROM-agar Candida	<i>C. albicans</i>	mensual
	<i>C. glabrata</i>	
Agar Chapman	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	mensual
	<i>S. epidermidis</i>	

Uso de calibradores: no aplica

6.3.3 Control de calidad de pruebas bioquímicas:

Requisitos de calidad: ausencia o presencia de reacciones bioquímicas esperadas según cada bacteria a probar.

- Los medios de cultivo se probarán inoculando en ellos distintas cepas según el medio
Las cepas a probar se encuentran congeladas, por lo tanto se deben descongelar previamente y se deben traspasar a agar sangre o Mc Conkey según corresponda.
- Registrar resultados (ANEXO 3 y 4)

En la siguiente tabla se detallan las pruebas bioquímicas a probar y su periodicidad:

Medio	Cepa control	Periodicidad
TSI	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>Ps. Aeruginosa</i> ATCC 27853	
	<i>Proteus mirabilis</i>	
LIA	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>Proteus mirabilis</i>	
	<i>Shigella spp.</i>	
MIO	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 81 de 118
		Fecha: enero 2021

UREA	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	
	<i>Proteus mirabilis</i>	
CITRATO	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	

Prueba	Cepa control	Periodicidad
Oxidasa	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Mensual
	<i>Ps. Aeruginosa</i> ATCC 27853	

Staphaureux plus	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	mensual
	<i>S. epidermidis</i>	
Telurito	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Mensual
	<i>E. faecium</i>	
Arabinosa	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Mensual
	<i>E. faecium</i>	
Optoquina	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	mensual
	<i>S. viridans</i>	
Catalasa	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	mensual
	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	

6.3.4 Control de calidad tinciones

Requisitos de calidad: correcta coloración según el grupo de bacterias: Bacilos Gram negativos=rojos, Cocáceas Gram positivas=azules.

Procedimiento de control: requiere el uso de una cepa Gram positiva y una cepa Gram negativa, realizando un extendido de estas y observando microscópicamente su afinidad tintorial

Registrar resultados (ANEXO 5)

Las cepas a probar y su periodicidad están descritas en la siguiente tabla:

Colorantes	Cepas a probar	Periodicidad
Cristal violeta, Lugol y Safranina	<i>Staphylococcus aureus</i>	mensual
	<i>Escherichia coli</i>	

Utilización de calibradores: no aplica

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 82 de 118
		Fecha: enero 2021

6.3.5 Control de calidad de esterilidad en la preparación de medios de cultivo:

Requisitos de calidad: corroborar que las placas no presenten contaminación bacteriana. En el laboratorio de microbiología del Hospital Claudio Vicuña se realiza la preparación y compra combinada de los distintos medios de cultivo utilizados. Es por esto que se realiza el control de nuestra parte a los medios que se preparan y se respalda con su inserto de calidad los medios de cultivos comerciales.

Se obtienen comercialmente placas de agar Sangre, agar Chocolate, agar Thayer Martin, agar VRE, agar Granada, agar ChromID STRB, agar Telurito de potasio, agar Mueller Hinton, agar Mueller Hinton Sangre, a los que se debe hacer una revisión visual para comprobar aspecto, esterilidad, recipiente indemne, control de Temperatura de traslado y almacenamiento

Registrar: Fecha, hora, lote del reactivo, nombre y firma de la persona que realiza la recepción y el control.

Se debe realizar un control de esterilidad de cada lote de placas preparadas en el laboratorio cada vez que se preparen, incubando a 35-37 °C el 100% de las placas durante 24 horas y un 5% al azar otras 24 horas.

Si no se obtuviese el resultado esperado (es decir, sin contaminación), descartar toda la partida y revisar:

- Modo de preparación del medio
- Forma de plaquar o dispensar en tubos, para encontrar el error y tomar acciones correctivas.
- Registrar resultados (ANEXO 6)

Uso De calibradores: no aplica

6.3.6 Control de equipos de mantención e incubación

Se revisara diariamente la temperatura de las estufas y refrigeradores, anotando los datos en los registros correspondientes a cada equipo, donde consta: fecha, hora, nombre y firma de la persona que realiza revisión. (ANEXO 7)

7.2.7 Control de Kits Reactivos

Todos los Kits comerciales, vienen con controles que se deben procesar tal como lo indica el inserto, al iniciar el uso de cada uno. Su resultado debe ser consignado en la carpeta de controles de cada Kit, donde se registrara: resultado, fecha, nº de lote, responsable de la ejecución. Los resultados y su interpretación darán cuenta de la calidad en la ejecución de la técnica realizada por el profesional. (ANEXO 8)

6.4 CONTROL DE CALIDAD PARA MEDICIONES CUALITATIVAS ASOCIADAS AL LABORATORIO DE SÍFILIS

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 83 de 118
		Fecha: enero 2021

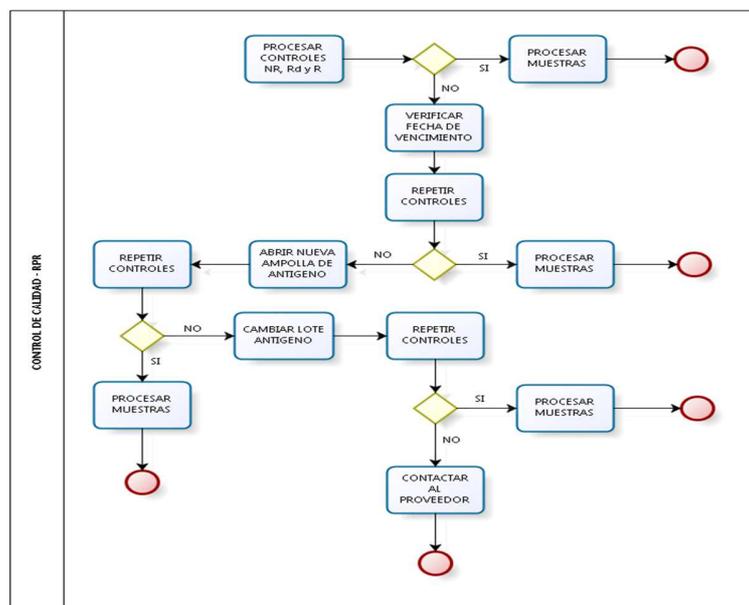
6.4.1 Control de calidad RPR

Requisito de calidad: correcta floculación de los controles utilizados: No Reactivo, Reactivo Débil y Reactivo.

1. Procesar con cada corrida de muestras, los controles NR, Rd y R.
2. Si los tres controles resultan de acuerdo a la reactividad esperada para cada uno, se aceptan los resultados de las muestras y se informan.
3. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado se rechaza la corrida de muestras, se verifica la fecha de vencimiento del kit de RPR y de los controles, volver a procesar los controles.
4. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras e informar.
5. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, usar otros controles del mismo lote.
6. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras e informar.
7. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, abrir una nueva ampolla de antígeno, del mismo lote, volver a procesar los controles.
8. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras e informar.
9. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, usar antígeno de distinto lote, procesar los controles.
10. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras e informar.
11. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, contactar con el proveedor.

Utilización de Calibradores: No aplica

Flujograma de Control de Calidad en RPR



	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 84 de 118
		Fecha: enero 2021

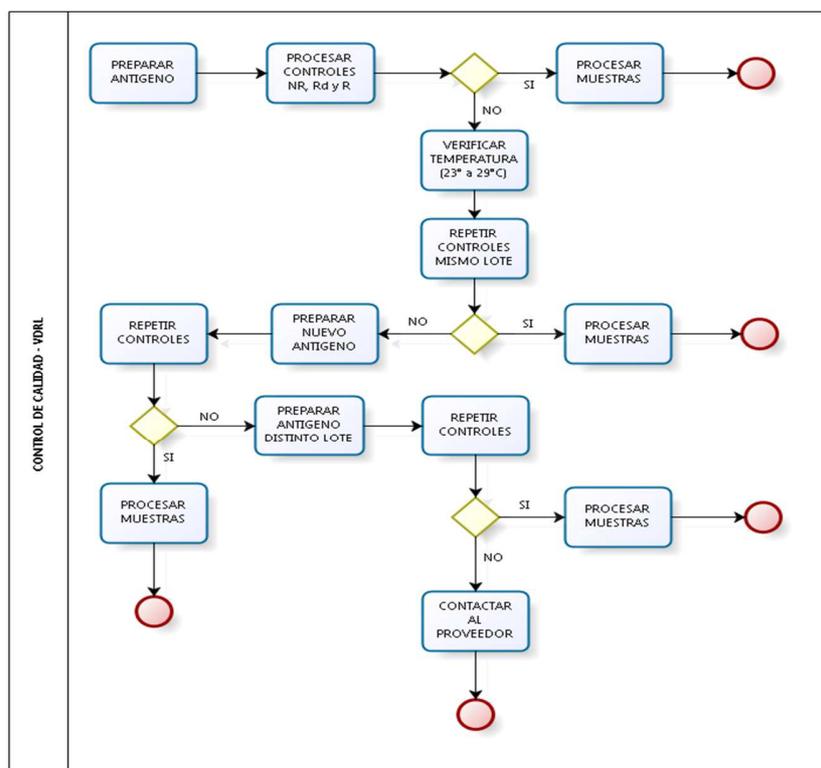
6.4.2 Control de calidad de VDRL

Requisito de calidad: correcta floculación de los controles utilizados: No Reactivo, Reactivo Débil y Reactivo (de titulación 1/4 a 1/16)

1. Antes de comenzar la técnica se debe verificar:
 2. Temperatura de la sala de procedimiento. Entre 23 y 29°C, siendo lo óptimo 25°C.
 3. Calibración de la aguja: 60 +-2 gotas por ml.
 4. Velocidad del rotador: 180 revoluciones por minuto.
 5. Tiempo del rotador con cronómetro.
 6. Procesar los controles NR, Rd y R.
 7. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras. Volver a procesar los controles junto con las muestras para asegurarse que el antígeno se mantenga estable durante el procedimiento.
 8. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, verificar temperatura de la sala y del material utilizado para la técnica, repetir los controles del mismo lote.
 9. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras e informar.
 10. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, usar controles de un distinto lote.
 11. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras e informar.
 12. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, medir pH del buffer (6.0 +-0.1), si el pH está fuera de rango, cambiar lote de antígeno, si el pH está dentro del rango preparar antígeno del mismo lote. Repetir los controles.
 13. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras e informar.
 14. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, volver a verificar temperatura, aguja y rotador, preparar antígeno de distinto lote. Volver a procesar los controles.
 15. Si los tres controles resultan de acuerdo a lo esperado, procesar las muestras e informar.
 16. Si uno o más controles no resultan de acuerdo a lo esperado, contactar al proveedor.
- Utilización de Calibradores: No aplica.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 85 de 118
		Fecha: enero 2021

Flujograma de Control de Calidad en VDRL



Powered by
bizagi
Modeler

6.4.3 Control de calidad de MHA-TP

Requisito de calidad: correcta microhemaglutinación de los controles utilizados: No Reactivo y Reactivo.

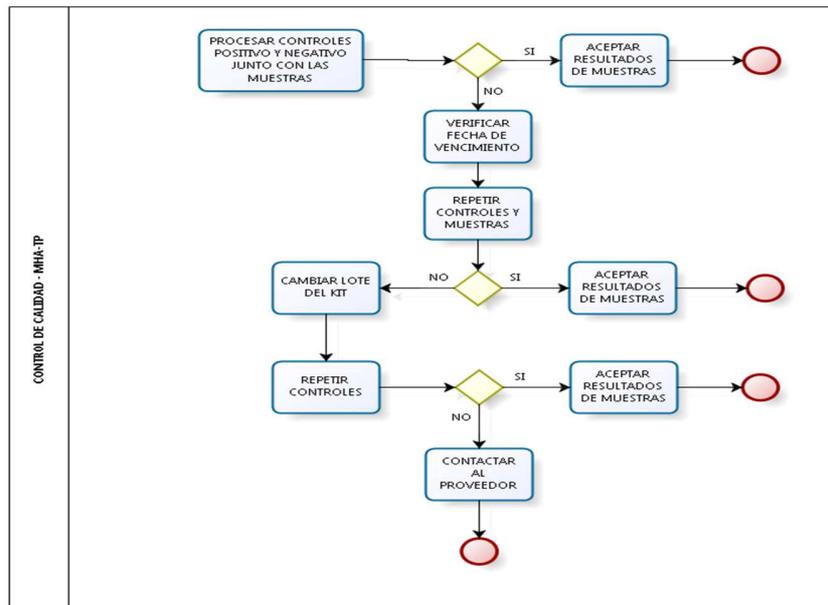
1. Procesar los controles Positivo y Negativo junto con las muestras.
2. Si ambos controles resultan de acuerdo a lo esperado, se aceptan los resultados de las muestras y se informan.
3. Si uno o los dos controles no resultan de acuerdo a lo esperado, verificar fecha de vencimiento del kit en uso y repetir los controles junto con las muestras.
4. Si ambos controles resultan de acuerdo a lo esperado, aceptar los resultados de las muestras e informar.
5. Si uno o los dos controles no resultan de acuerdo a lo esperado, abrir un nuevo kit, de distinto lote, repetir las muestras y los controles.
6. Si ambos controles resultan de acuerdo a lo esperado, aceptar los resultados de las muestras e informar.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 86 de 118
		Fecha: enero 2021

7. Si uno o los dos controles no resultan de acuerdo a lo esperado, contactar al proveedor.

Utilización de Calibradores: No aplica

Flujograma de Control de Calidad en MHA-TP



Powered by
bizagi
Modeler

6.5 CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE MICOBACTERIAS

6.5.1 Control de Calidad de Baciloscopias

La Baciloscopia es una técnica económica que se utiliza como diagnóstico y control de tratamiento de la Tuberculosis.

Para que esta sea una buena herramienta de control, se necesita una óptima calidad técnica, calidad en los registros, informes y análisis de la información que produce el laboratorio.

El CCI permite la evaluación de materiales, equipos y reactivos, del desempeño personal, los procedimientos, de la precisión y oportunidad de los informes. Permite visualizar los puntos críticos y así poder aplicar medidas preventivas y correctivas pensando siempre en un proceso de mejora continua.

Requisitos de Calidad El CCI para la Baciloscopia deberá centrarse en cuatro apartados:

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 87 de 118
		Fecha: enero 2021

- 1) **Preparación del extendido:** Debe controlarse la técnica del extendido siguiendo las indicaciones del procedimiento estandarizado y con el cuidado que la muestra forme una película uniforme.
- 2) **Reactivos de la tinción:** Cada vez que se prepare alguno de los colorantes para la tinción de Ziehl-Neelsen, se debe comprobar la capacidad de tinción para los bacilos ácido-alcohol-resistente, realizando dicha coloración a extendidos preparados y observando si existe buena coloración del bacilo y del material de contraste.
- 3) **Procedimiento de tinción:** En cada serie de coloración de Ziehl-Neelsen, se debe incluir un extendido preparado de muestras positivas para verificar el proceso de coloración y la intensidad de la coloración de los organismos ácido-alcohol-resistentes. Las extensiones y tinciones se realizarán igual que en cualquier muestra clínica. Los resultados deberán registrarse. Cuando estos no sean correctos se debe revisar el procedimiento y los reactivos.
- 4) **Lectura de la lámina:** Durante la lectura de la muestra con el objetivo 100x, debe controlarse la calidad de la muestra, del extendido y de la tinción.
 - Se deben seleccionar muestras positivas y negativas para hacer una microteca.
 - Tratar las muestras durante media hora con 10 gotas de fenol al 10%.
 - Realizar la mayor cantidad posible de extendidos, los cuales serán guardados en cajas adecuadas (Extendidos para CCI) debidamente identificados.
 - Se teñirá un extendido positivo y uno negativo una vez a la semana y cada vez que:
 - Se prepara un nuevo stock de colorantes o cambio en el número de lote.
 - Se cambia al personal encargado de la preparación de reactivos o de la técnica de tinción.

Se hará lectura de los extendidos de control en relación a la primera lectura de estos y se registrarán las lecturas intra microscopista para comparar las diferentes lecturas del mismo observador y de la misma lámina en duplicado; e inter microscopista para comparar la lectura de una misma lamina entre diferentes observadores. (ANEXO 10: tablas de registro intra e inter microscopista).

Esto permite la detección de errores en la metodología del procedimiento, para tomar acciones correctivas.

Utilización de Calibradores: No Aplica

6.5.2 Control de Calidad Cultivos

- a) **Requisito de Calidad:** El medio de cultivo Lowenstein Jensen se obtienen de manera comercial. Estos, al momento de ser recibidos deben ser chequeados en cuanto a:
 - **Color:** diferentes intensidades de verde evidencian mala homogenización o residuos en los tubos.
 - Verde muy oscuro: exceso de verde malaquita o pH muy ácido.
 - Medio amarillento: falta de verde malaquita o pH muy alcalino.
 - **Consistencia:** medio que se desintegra fácilmente es porque la T° de coagulación no fue suficiente. Estos no deben ser usados para la siembra

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 88 de 118
		Fecha: enero 2021

- **Textura/homogeneidad:** si se observan burbujas puede ser un problema en la dispensación del medio en los tubos. Si se observan burbujas post coagulación, es posible que haya sido sometido a altas temperaturas. No deben visualizarse grumos (mala homogenización).

b) Hacer análisis en cuanto a la contaminación de los cultivos:

Muestras contaminadas

- Investigar si transcurrió un tiempo excesivo entre el momento de la toma de muestra y el procesamiento de la misma.
- Realizar técnicas más energéticas de descontaminación para tratar muestras sucesivas de ese individuo.
- Si se repite la contaminación de muestras de un servicio determinado, se coordina envíos más oportunos y en condiciones más apropiadas
- Entregar información a los servicios en que se pesquise deficiencias en la toma y envío de muestras al laboratorio.

Contaminaciones sistemáticas

- Verificar la esterilidad de los reactivos utilizados en el proceso de descontaminación
- Visualizar los pasos consecutivos en la realización de la técnica
- Reorganizar el tiempo de transporte y rutina de trabajo del laboratorio.
- Se capacitará periódicamente al personal técnico y profesional.

Incremento inusual del número de cultivos positivos en un corto período de tiempo

- Investigar la posibilidad de que sea una contaminación cruzada
- Investigar si los pacientes involucrados tienen clínica compatible con TBC.
- Ver si se repite el mismo aislamiento a partir de otra muestra del mismo paciente
- Revisar procedimiento de la técnica de cultivo.
- Revisar si se mantiene el orden adecuado para el procesamiento de las muestras.

Utilización de Calibradores: No Aplica

6.6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS, BATERÍAS BIOQUÍMICAS Y MEDIOS DE CULTIVOS

6.6.1 PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Haciendo correcto uso de los elementos de protección personal, reunir todos los materiales necesarios

a) **FENOL ACUOSO**

Fenol cristalizado 1 kg
100 ml de agua destilada.

1. Calentar a baño maría (máximo 70 °C) 1 kg de fenol cristalizado hasta su completa disolución y agregar 100 ml de agua destilada.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 89 de 118
		Fecha: enero 2021

2. Se mantiene en frasco ámbar y a temperatura ambiente.

PRECAUCIÓN: inflamable, tóxico.

b) FUCSINA FENIFICADA

Fucsina básica 10 gr.

Alcohol de 95° 100 ml.

Fenol acuoso 55 ml.

Agua c.s.p. 1000 ml.

1. En un mortero se trituran los 10 gr de fucsina y se disuelven con los 100 ml de alcohol, agregando lentamente.
2. Calentar, aproximadamente a 70 °C, 500 ml de agua y agregar los 55 ml de fenol acuoso.
3. La fucsina disuelta en el alcohol se vacía a un matraz aforado y se le agrega de a poco el agua fenicada y luego aforar a 1000 ml con el resto del agua destilada. Cuando este frío, poner parafilm en la boca del matraz y mezclar por inversión.
4. Dejar en reposo y protegido de la luz durante 24 horas y filtrar.
5. Envasar en frasco ámbar (duración máxima: un mes).

c) AZUL DE METILENO

Azul de metileno 1 gr.

Alcohol de 95° 20 ml.

Agua destilada c.s.p. 1000 ml

Ácido acético glacial 50 ml.

1. En matraz aforado disolver el azul de metileno con el alcohol por agitación.
2. Agregar el ácido acético glacial y llevar a 1000 ml con el agua destilada.
3. Mezclar, filtrar y guardar en frasco ámbar.

d) SOLUCIÓN DECOLORANTE

Ácido clorhídrico (37%) 30 ml.

Alcohol de 95° 970 ml.

1. Dejar escurrir el ácido clorhídrico por las paredes del matraz que contiene el alcohol; con una pipeta se agita suavemente hasta observar su completa disolución.
PRECAUCIÓN: inflamable y corrosivo.

e) HIDROXIDO DE SODIO AL 3.5%

NaOH 35 gr.

Agua destilada c.s.p. 1000 ml.

1. En un matraz aforado disponer una parte del agua destilada y agregar la soda, poner parafilm en la boca del matraz, mezclar y disolver por agitación.
2. Dejar enfriar y luego aforar a 1000 ml con el resto del agua destilada. Tapar y mezclar.
PRECAUCIÓN: corrosivo.

f) HIDROXIDO DE SODIO AL 2%

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 90 de 118
		Fecha: enero 2021

NaOH 20 gr.

Agua destilada c.s.p. 1000 ml.

1. En un matraz aforado disponer una parte del agua destilada y agregar la soda, poner parafilm en la boca del matraz, mezclar y disolver por agitación.
2. Dejar enfriar y luego aforar a 1000 ml con el resto del agua destilada. Tapar y mezclar.

PRECAUCIÓN: corrosivo

g) **INDICADOR AL 10 % (TORNASOL) solución madre.**

Tornasol p.a. 10 gr.

Agua destilada 100 ml

1. Disolver en autoclave por 20 minutos.
2. Alicuotar en tubos estériles, con 7 ml cada uno.

h) **ACIDO SULFURICO AL 7%**

Ácido sulfúrico 70 ml

Agua destilada 930 ml

Indicador Tornasol al 10% 7ml

1. Al agua destilada, por las paredes del matraz, agregar suavemente el ácido sulfúrico.
2. Dejar enfriar y agregar el indicador. Mezclar suavemente

PRECAUCIÓN: corrosivo.

6.6.2 PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DE BATERIAS

El TP será el responsable de la preparación y junto con el TM de controlar el stock de los medios de cultivo en el laboratorio de microbiología.

MATERIALES

- Diferentes tipos de agares
- Agua destilada estéril
- Algodón Carde
- Placas de cultivo estériles
- Cuchara de palo
- Espátula
- Olla
- Papel kraft

EQUIPOS

- Pesa analítica
- Estufa de incubación
- Autoclave
- Mechero
- Cocinilla a gas
- Vasos de precipitado
- Probetas de 100, 500 y 1000 ml

	Hospital Claudio Vicuña Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
		Página 91 de 118
		Fecha: enero 2021

- Matraces pyrex 250, 500 y 1000 ml.

a) TSI (Triple Sugar Iron)

Pesar 16.25 grs. de agar TSI para 250 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución y llevar a ebullición. Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.4 ± 0.2 .
- Distribuir aproximadamente 2.5 ml del agar en tubos de 12x120 mm. Taponar con algodón Carde. Colocar en un recipiente, envolver con papel kraft y autoclavar durante 15 minutos a 121 °C.
- Retirar del autoclave y enfriar los tubos tendidos, de manera que el agar quede medio de fondo y medio tendido.
- Rotular con nombre y fecha. Llevar a estufa por 24 horas a 35-37 °C para control de esterilidad.

b) LIA (Lysine Iron Agar)

Pesar 8.5 grs. de agar LIA para 250 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución y llevar a ebullición. Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 6.7 ± 0.2 .
- Distribuir aproximadamente 2.5 ml del agar en tubos de 12x120 mm. Taponar con algodón Carde. Colocar en un recipiente, envolver con papel kraft y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
- Retirar del autoclave y enfriar los tubos tendidos, de manera que el agar quede medio de fondo y medio tendido.
- Rotular con nombre y fecha. Llevar a estufa por 24 horas a 35-37 °C para control de esterilidad.

c) MIO (Motility Indole Ornithine)

Pesar 7.75 grs. de agar MIO para 250 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución y llevar a ebullición. Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 6.5 ± 0.2 .

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 92 de 118
		Fecha: enero 2021

- Distribuir aproximadamente 2.5 ml del agar en tubos de 12x120mm. Taponar con algodón Carde. Colocar en un recipiente, envolver con papel kraft y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
- Retirar del autoclave y enfriar los tubos en posición vertical, sin extender.
- Rotular con nombre y fecha. Llevar a estufa por 24 horas a 35-37 °C para control de esterilidad.

d) Citrato de Simmons

Pesar 5.75 grs. de agar citrato para 250 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución y llevar a ebullición. Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.0 ± 0.2 .
- Distribuir aproximadamente 2.5 ml del agar en tubos de 12x120mm. Taponar con algodón Carde. Colocar en un recipiente, envolver con papel kraft y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
- Retirar del autoclave y enfriar los tubos tendidos, de manera que el agar quede extendido totalmente.
- Rotular con nombre y fecha. Llevar a estufa por 24 horas a 35-37 °C para control de esterilidad.

e) Urea de Christensen

Pesar 6 grs. de agar para 237 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución y llevar a ebullición. Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 6.8 ± 0.2 .
- Envasar en matraz Pyrex de 500 ml y autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- Retirar del autoclave y agregar en forma estéril 5 grs. de urea disueltos en 12.5 ml de agua destilada estéril.
- Distribuir aproximadamente 2.5 ml del agar en tubos de 12x120mm y enfriar los tubos tendidos, de manera que el agar quede medio de fondo y medio tendido.
- Rotular con nombre y fecha. Llevar a estufa por 24 horas a 35-37 °C para control de esterilidad.

6.6.3 PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

a) Agar Sangre

Pesar 40 grs. de agar Trypticase OXOID para 1 litro de agua destilada estéril, medida en una probeta de 1 litro.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 93 de 118
		Fecha: enero 2021

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.3 ± 0.2 .
- Envasar en matraz Pyrex y cerrar con tapa plástica dejándola ligeramente abierta. Rotular el matraz con el nombre y autoclavar durante 15 minutos a 121°C .
- Retirar del autoclave y esperar que se enfríe hasta los 50°C , para lo que se recomienda poner en un baño maría a 50°C .

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Agregar al medio de cultivo 40 ml de sangre de cordero a temperatura ambiente, mezclar suavemente por rotación y distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente $1/3$ de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Incubar todas las placas en estufa a $35-37^\circ\text{C}$ por 24 horas para el control de esterilidad.

b) **Agar Mc Conkey**

Pesar 51.5 grs. de agar Mc Conkey para 1 litro de agua destilada estéril, medida en una probeta de 1 litro.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.1 ± 0.2 .
- Envasar en matraz Pyrex y cerrar con tapa plástica dejándola ligeramente abierta. Rotular el matraz con el nombre y autoclavar durante 15 minutos a 121°C .
- Retirar del autoclave y esperar que se enfríe hasta los 50°C , para lo que se recomienda poner en un baño maría a 50°C .

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente $1/3$ de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Incubar todas las placas en estufa a $35-37^\circ\text{C}$ por 24 horas para el control de esterilidad.

c) **Agar Cromogénico ITU**

Pesar 56.3 grs. de agar cromogénico ITU para 1 litro de agua destilada estéril, medida en una probeta de 1 litro.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 94 de 118
		Fecha: enero 2021

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 6.8 ± 0.2 .
- Envasar en matraz Pyrex y cerrar con tapa plástica dejándola ligeramente abierta. Rotular el matraz con el nombre y autoclavar durante 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Retirar del autoclave y esperar que se enfríe hasta los $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, para lo que se recomienda poner en un baño maría a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente $1/3$ de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Guardar protegido de la luz, envuelto en plástico negro.
- Incubar todas las placas en estufa a $35-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para el control de esterilidad.

d) **Agar Manitol Sal (Chapman)**

Pesar 55.5 grs. de agar Chapman para 500 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.5 ± 0.2 .
- Envasar en matraz Pyrex y cerrar con tapa plástica dejándola ligeramente abierta. Rotular el matraz con el nombre y autoclavar durante 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Retirar del autoclave y esperar que se enfríe hasta los $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, para lo que se recomienda poner en un baño maría a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente $1/3$ de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Incubar todas las placas en estufa a $35-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para el control de esterilidad.

e) **Agar DNAsa**

Pesar 12.6 grs. de agar DNAsa para 300 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 95 de 118
		Fecha: enero 2021

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.3 ± 0.2 .
- Envasar en matraz Pyrex, agregar 7.5 ml de solución de Toluidina y cerrar con tapa plástica dejándola ligeramente abierta. Rotular el matraz con el nombre y autoclavar durante 15 minutos a 121°C .
- Retirar del autoclave y esperar que se enfríe hasta los 50°C , para lo que se recomienda poner en un baño maría a 50°C .

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente $1/3$ de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Incubar todas las placas en estufa a $35-37^\circ\text{C}$ por 24 horas para el control de esterilidad.

f) **Agar Mueller Hinton**

Pesar 38 grs. de agar Mueller Hinton para 1 litro de agua destilada estéril, medida en una probeta de 1 litro.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.3 ± 0.1 .
- Envasar en matraz Pyrex y cerrar con tapa plástica dejándola ligeramente abierta. Rotular el matraz con el nombre y autoclavar durante 15 minutos a 121°C .
- Retirar del autoclave y esperar que se enfríe hasta los 50°C , para lo que se recomienda poner en un baño maría a 50°C .

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente $1/3$ de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Incubar todas las placas en estufa a $35-37^\circ\text{C}$ por 24 horas para el control de esterilidad.

g) **Agar Mueller Hinton Sangre 5%**

Pesar 19 grs. de agar Mueller Hinton para 500 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 96 de 118
		Fecha: enero 2021

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.3 ± 0.2 .
- Envasar en matraz Pyrex y cerrar con tapa plástica dejándola ligeramente abierta. Rotular el matraz con el nombre y autoclavar durante 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Retirar del autoclave y esperar que se enfríe hasta los $50 \text{ }^\circ\text{C}$, para lo que se recomienda poner en un baño maría a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Agregar al medio de cultivo 20 ml de sangre de cordero a temperatura ambiente, mezclar suavemente por rotación y distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente $1/3$ de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Incubar todas las placas en estufa a $35-37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas para el control de esterilidad.

h) **Agar SS**

Pesar 28.5 grs. de agar SS para 500 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 7.3 ± 0.2 .

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente $1/3$ de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Incubar todas las placas en estufa a $35-37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas para el control de esterilidad.

i) **Agar TCBS**

Pesar 44 grs. de agar TCBS para 500 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto. Enfriar un poco para medir el pH que debe quedar en 8.6 ± 0.2 .

Para la distribución en las placas estériles

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 97 de 118
		Fecha: enero 2021

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente 1/3 de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Incubar todas las placas en estufa a 35-37 °C por 24 horas para el control de esterilidad.

j) Agar CHROM-agar Candida

Pesar 6.5 grs. de CHROM-agar Candida para 100 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 500 ml.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto.

Para la distribución en las placas estériles

- Cerrar el área de trabajo, encender mechero, distribuir las placas en el mesón limpio.
- Distribuir en las placas la cantidad suficiente, aproximadamente 1/3 de la placa, con una altura de 4mm.
- Dejar reposar aproximadamente media hora a temperatura ambiente para su solidificación. Rotular con nombre y fecha.
- Guardar protegido de la luz, envuelto en plástico negro.
- Incubar todas las placas en estufa a 35-37 °C por 24 horas para el control de esterilidad.

k) Agar Soya Trypticosa con glicerol al 20%

Pesar 1.85 grs. de caldo Cerebro-Corazón (BHI) y medir 10 ml de glicerol para 40 ml de agua destilada estéril, medida en una probeta de 100 ml.

- En una olla limpia poner el agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo.
- Autoclavar durante 15 minutos a 121 °C. Una vez frío, agregar el glicerol con pipeta estéril y cerca del mechero.
- Distribuir de 1 ml en criotubos estériles.

l) Agar para conservación de cepas

Pesar 0.5 gr de extracto de carne, 1.0 gr de peptona, 0.5 gr de NaCl, 1.0 gr de Agar-Agar para 1000 ml de agua destilada, medida en una probeta de 1 litro.

- En una olla limpia poner la mitad del agua destilada y entibiar en la cocinilla para disolver el polvo. Con llama baja agregar el resto del agua, revolver con cuchara de palo hasta completar la disolución.
- Probar entre los dedos la disolución de modo que no tenga grumos. Hervir durante 1 minuto.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 98 de 118
		Fecha: enero 2021

- Distribuir aproximadamente 2.5 ml del agar en tubos Khan plásticos, tapar con algodón y llevar a autoclave por 15 minutos a 121 °C. dejar enfriar.
- Rotular con nombre y fecha. Llevar a estufa por 24 horas a 35-37 °C para control de esterilidad.

6.7 TIEMPOS DE RESPUESTA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

CODIGO	EXAMENES	TIEMPO RESPUESTA
03-08-05	Leucocitos fecales	De rutina: 24 horas
		Proveniente de servicio urgencia: 2 horas
03-06-011	Urocultivo/Antibiograma	Resultado negativo: 24 horas
		Resultado positivo: identificación y antibiograma: hasta 96 horas
03-06-007	Coprocultivo	Resultado negativo: 72 horas
		Resultado positivo: identificación y antibiograma: hasta 96 horas
03-06-009	Hemocultivo ¹	Resultado positivo: 2 horas para informar Gram
		Cultivo y Antibiograma: 48 – 72 horas
		Resultado negativo: 5 días
03-06-008	Cultivo de CVC	Resultado negativo: 48 horas
		Resultado positivo: identificación y antibiograma: hasta 96 horas
03-06-008	Cultivo corriente: Secreciones	Resultado negativo: 48 horas
		Resultado positivo: identificación y antibiograma: hasta 96 horas
03-06-008	Líquido Cefalorraquídeo	Resultado positivo: 2 horas para informar Gram
		Cultivo y Antibiograma: 48 - 72 horas
		Resultado negativo: 72 horas
03-06-008	Líquidos Biológicos	Resultado negativo: 72 horas
		Resultado positivo: identificación y antibiograma: hasta 96 horas
03-06-016	Búsqueda de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Resultado negativo: 48 horas
		Resultado positivo: identificación y antibiograma: hasta 96 horas
03-06-008	Búsqueda de <i>Streptococcus</i> grupo B	Resultado negativo: 48 horas
		Resultado positivo: identificación y antibiograma: hasta 96 horas
09-00-013	VRE	Resultado negativo: 48 horas
		Resultado positivo: identificación y antibiograma: hasta 96 horas
03-05-008	ASLO	24-48 horas

¹ En relación a los tiempos de respuesta de los cultivos positivos, la mayoría de estos pueden ser informados dentro de 48-72 horas, aunque existe retraso en los informes de ciertas muestras con más de un microorganismo, en las cuales se debe realizar aislamientos, y/o bacterias fastidiosas de desarrollo lento y de difícil identificación.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 99 de 118
		Fecha: enero 2021

03-06-039	WIDAL	24-48 horas
03-10-001	Toxina A/B <i>Clostridium difficile</i>	24 horas
03-06-023	<i>Ureaplasma/Mycoplasma</i>	48 horas
03-06-034	<i>Chlamydia trachomatis</i> (genital)	24-48 horas
03-06-070	Influenza A/B	24 horas
09-00-012	VRS	24 horas
03-06-038	RPR	24-48 horas
03-06-042	VDRL	5 días
03-06-041	MHA-TP	24-48 horas
03-06-001	Baciloscopía, Z-N (orina)	Resultado Baciloscopía negativo: 48 horas
03-06-002	Baciloscopía, Z-N	Resultado Baciloscopía positivo: en el momento
03-06-018	Cultivo de Koch	La lectura se realiza semanalmente. Informe final a los 60 días
03-06-082	PCR MTB	Resultado PCR MTB: 48 horas

6.8. Procedimientos de Informe de Resultados

Los resultados de los exámenes son ingresados y validados en el sistema informático de Bacteriología llamado Epicenter, luego de esto, dicha información es traspasada a los informes de resultados del LIS del Laboratorio para que puedan ser visualizados. Solo se imprimirán físicamente los resultados de consultorios que no estén conectados a nuestro LIS y tendrán que retirar los exámenes directamente desde la secretaría del laboratorio. Para el resto, se realiza una impresión virtual permitiendo la transmisión de resultados a los servicios conectados.

Todos los resultados con valores críticos serán informados de acuerdo a manual y protocolo de alerta de valores críticos AOC 1.3. Para poder validar el resultado, el sistema requiere el ingreso del nombre de la persona quien recibió el aviso.

6.9. Eliminación de Muestras

Una vez finalizados los diversos procedimientos, la eliminación del material biológico tanto de las secciones de TBC como de Bacteriología y que tengan relación con el crecimiento de agentes patógenos como son los cultivos, son retirados en el carro de transporte exclusivo para este fin y es llevado a la sala de lavado de material donde se autoclave y después se elimina.

Las demás muestras se eliminan de acuerdo a los Protocolos de REAS.

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 100 de 118
		Fecha: enero 2021

6.10 Derivación de Cepas al ISP

La Epidemiología es básicamente, el estudio de los problemas de salud o los eventos que ocurren a las personas, tomadas a nivel de población, obteniendo tasas que son comparables en el tiempo, para ser usadas en el control y prevención de las enfermedades. Esta ciencia tiene como sustento la notificación del fenómeno estudiado, y para ello, históricamente, se ha usado la vigilancia de morbilidad, es decir, una notificación basada en hallazgos clínicos, siendo los resultados de laboratorio usados solamente para confirmar el diagnóstico. Sin embargo desde 1999, en que se inicia la revisión del Reglamento sobre **Notificación de Enfermedades de Declaración Obligatoria** donde se incluyen además del Sistema de Vigilancia de Morbilidad, el Sistema de Vigilancia Ambiental y el Sistema de Vigilancia de Laboratorio. Este último define el rol de los laboratorios públicos y privados en la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles, y establece la obligatoriedad de notificar la detección en el laboratorio de los agentes etiológicos allí definidos, todo lo cual se plasma en el Decreto Supremo N° 158 de 2004 (ENO).

El responsable de la preparación de la Cepa es el Tecnólogo médico y el responsable del envío y embalaje (triple embalaje) es la TENS de la sección de Microbiología.

Las cepas serán enviadas en agar para conservación de cepas, Agar sangre, chocolate, Thayer Martin o Lowenstein Jensen, según sea su requerimiento nutricional.

Las muestras de Hanta virus, Sarampión, Rubéola, etc., se enviarán según las indicaciones descritas en www.ispch.cl

Las cepas a enviar serán registradas en el cuaderno de "ISP", y las respuestas del Instituto serán archivadas en secretaría.

Cada cepa debe ser enviada con su formulario respectivo:

- a) B1: "Formulario de envíos cepas bacterianas"
- b) B3: "Formulario de envío para estudio de vigilancia resistencia antimicrobiana"
- c) "Formulario para envío de muestras y/o cultivos, Laboratorio Referencia Micobacterias"
- d) Todos los formularios, cualquiera sea la necesidad, se pueden encontrar en la página web www.ispch.cl

CEPAS A ENVIAR

- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Haemophilus influenzae* en enfermedad invasora
- *Neisseria meningitidis*
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Vibrio cholerae*
- *Salmonella spp*
- *Shigella spp.*
- *Streptococcus pneumoniae* en enfermedad invasora
- *Streptococcus* grupo B en enfermedad invasora

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 101 de 118
		Fecha: enero 2021

- *Listeria monocytogenes*
- *Mycobacterium tuberculosis*

Además, los siguientes microorganismos, por presentar patrones específicos de resistencia a los antimicrobianos de importancia para la salud pública, o por requerir exámenes especiales para diagnosticar resistencia se enviarán a estudio de laboratorio de microbiología del ISP:

a) **Cocáceas Gram positivo**

- *Staphylococcus aureus*
- Todas las cepas que presenten resistencia propiamente tal o resistencia intermedia a Vancomicina, independiente del tipo de muestra.
- Todas las cepas resistentes a Cloxacilina aisladas de hemocultivo.
 - *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*
- Todas las cepas aisladas de muestras clínicas obtenidas con fines diagnósticos que presenten resistencia propiamente tal o resistencia intermedia a Vancomicina, excluyendo aquellas aisladas de hisopados rectales como parte de estudios de colonización.

b) **Enterobacterias**

- *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter spp.*
- Todas las cepas, independiente del tipo de muestra de la que se aíslen, que presenten resistencia a Imipenem o Meropenem con halos de inhibición menores o iguales a 22 milímetros o Concentración mínima inhibitoria (CMI) mayor o igual a 2 microorganismos/mililitros.
- Todas las cepas de Enterobacterias, independiente del tipo de muestra de la que se aíslen y de susceptibilidad a Imipenem o Meropenem, que presenten

resultados positivos a las pruebas de tamizaje para la detección de carbapenemasas recomendadas por el ISP.

c) **Hongos**

- Levaduras
- Todas las cepas del género *Candida* aisladas de hemocultivos periféricos.

7. Criterios de calidad

N/A

8. Flujograma

N/A

9. Distribución

CC Laboratorio Clínico

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 102 de 118
		Fecha: enero 2021

10. ANEXOS

ANEXO 1: CONTROL DE CALIDAD PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ATCC

MES					
RESPONSABLE					
LOTE AGAR					
MARCA AGAR					
CEPA	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				
UROCULTIVO					
Antimicrobiano	Potencia disco	Nº Lote	Fecha expiración	Resultado	Rango Aceptable (mm)
Cefradina	30 µg				21 - 27
Cefotaxima	30 µg				29 - 35
Cefpodoxima	10 µg				23 - 28
Nitrofurantoína	300 µg				20 - 25
Ciprofloxacino	5 µg				30 - 40
Gentamicina	10 µg				19 - 26
Cotrimoxazol	1.25/23.75 µg				23 - 29
SECRECIONES					
Cefradina	30 µg				21 - 27
Cefotaxima	30 µg				29 - 35
Cotrimoxazol	1.25/23.75 µg				23 - 29
Ciprofloxacino	5 µg				30 - 40
Gentamicina	10 µg				19 - 26
Cloranfenicol	30 µg				21 - 27
COMPLEMENTARIO					
Amikacina	30 µg				19 - 26
Aztreonam	30 µg				28 - 36
Imipenem	10 µg				26 - 32
Meropenem	10 µg				28 - 34
Ertapenem	10 µg				29 - 36
CTX - Ac. Clav.	30/10 µg				--
CAZ - Ac. Clav.	30/10 µg				--
Ceftazidima	30 µg				25 - 32
Cefotaxima	30 µg				29 - 35
COPROCULTIVO					
Ceftriaxona	30 µg				29 - 35
Cloranfenicol	30 µg				21 - 27
Ciprofloxacino	5 µg				30 - 40
Ampicilina	10 µg				16 - 22
Cotrimoxazol	1.25/23.75 µg				23 - 29

ACCIONES CORRECTIVAS

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 103 de 118
		Fecha: enero 2021

MES					
RESPONSABLE					
LOTE AGAR					
MARCA AGAR					
CEPA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853				
Antimicrobiano	Potencia disco	Nº Lote	Fecha expiración	Resultado	Rango Aceptable (mm)
Ciprofloxacino	5 µg				25 - 33
Gentamicina	10 µg				17 - 23
Amikacina	30 µg				18 - 26
Levofloxacino	5 µg				19 - 26
Aztreonam	30 µg				23 - 29
Ceftazidima	30 µg				22 - 29
Cefepime	30 µg				24 - 30
Meropenem	10 µg				27 - 33
Imipenem	10 µg				20 - 28
Pipe - Tazo	100/10 µg				25 - 33

ACCIONES CORRECTIVAS

MES					
RESPONSABLE					
LOTE AGAR					
MARCA AGAR					
CEPA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603				
Antimicrobiano	Potencia disco	Nº Lote	Fecha expiración	Resultado	Rango Aceptable (mm)
Cefotaxima	30 µg				29 - 35
CTX - Ac Clav.	30/10 µg				≥ 5 mm CTX
Ceftazidima	30 µg				25 - 32
CAZ - Ac Clav.	30/10 µg				≥ 5 mm CAZ

ACCIONES CORRECTIVAS

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Edición: segunda
		Página 104 de 118
		Fecha: enero 2021

MES					
RESPONSABLE					
LOTE AGAR					
MARCA AGAR					
CEPA	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				
UROCULTIVO					
Antimicrobiano	Potencia disco	Nº Lote	Fecha expiración	Resultado	Rango Aceptable (mm)
Nitrofurantoína	300 µg				18 - 22
Ciprofloxacino	5 µg				22 - 30
Cotrimoxazol	1.25/23.75 µg				24 - 32
Doxiciclina	30 µg				23 - 29
Gentamicina	10 µg				19 - 27
Cefoxitina	30 µg				23 - 29
Oxacilina	1 µg				18 - 24
Novobiocina	5 µg				--
SECRECIONES					
Ciprofloxacino	5 µg				22 - 30
Cotrimoxazol	1.25/23.75 µg				24 - 32
Clindamicina	2 µg				24 - 30
Eritromicina	15 µg				22 - 30
Doxiciclina	30 µg				23 - 29
Penicilina	10 U				26 - 37
COMPLEMENTARIO					
Rifampicina	5 µg				26 - 34
Gentamicina	10 µg				19 - 27
Cloranfenicol	30 µg				19 - 26
Vancomicina	30 µg				17 - 21
CIM Vancomicina	0.015 µg/ml				--
Enterococcus					
Ampicilina	10 µg				27 - 35
Nitrofurantoína	300 µg				18 - 22
Ciprofloxacino	5 µg				22 - 30
Doxiciclina	30 µg				23 - 29
Teicoplanina	30 µg				15 - 21
Linezolid	30 µg				25 - 32

ACCIONES CORRECTIVAS

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3
			Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 105 de 118
			Fecha: enero 2021

MES					
RESPONSABLE					
LOTE AGAR					
MARCA AGAR					
CEPA	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619				
Antimicrobiano	Potencia disco	Nº Lote	Fecha expiración	Resultado	Rango Aceptable (mm)
Cefotaxima (CIM)	0.002 µg/ml				--
Cefotaxima	30 µg				31 - 39
Optoquina	5 µg				--
Penicilina	10 U				24 - 30
Ampicilina	10 µg				30 - 36
Eritromicina	15 µg				25 - 30
Clindamicina	2 µg				19 - 25
Nitrofurantoína	300 µg				23 - 29
Vancomicina	30 µg				20 - 27
Cloranfenicol	30 µg				23 - 27
Oxacilina	1 µg				≤ 12

ACCIONES CORRECTIVAS

MES					
RESPONSABLE					
LOTE AGAR					
MARCA AGAR					
CEPA	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218				
Antimicrobiano	Potencia disco	Nº Lote	Fecha expiración	Resultado	Rango Aceptable (mm)
Amoxi - Ac clav.	20/10 µg				17-22
CTX - Ac clav.	30/10 µg				--
CAZ - Ac clav.	30/10 µg				--

ACCIONES CORRECTIVAS

MES					
RESPONSABLE					
LOTE AGAR					
MARCA AGAR					

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 106 de 118
		Fecha: enero 2021

CEPA	Staphylococcus aureus BAA-97				
Antimicrobiano	Potencia disco	Nº Lote	Fecha expiración	Resultado	Rango Aceptable (mm)
Eritromicina	15 µg				--
Clindamicina	2 µg				--
Test D	--				Positivo

ACCIONES CORRECTIVAS

ANEXO 2: CONTROL DE CALIDAD PARA MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE CULTIVO	FECHA	Nº LOTE	CEPA CONTROL	ESPERADO	RESULTADO	TM	COMENTARIOS
Agar Sangre			<i>S. aureus</i>	β hemólisis			
			<i>S. pneumoniae</i>	α hemólisis			
Agar Mc Conkey			<i>E. coli</i>	Lactosa +			
			<i>P. mirabilis</i>	Lactosa -			
Agar cromogénico o ITU			<i>E. coli</i>	Púrpura			
			<i>K. pneumoniae</i>	Azul			
			<i>E. faecalis</i>	Calipso			
Agar SS			<i>Salmonella spp.</i>	Lactosa -, centro negro			
			<i>Shigella spp.</i>	Lactosa -			
Mc Conkey Sorbitol			<i>E. coli</i> O:157	Sorbitol -			
			<i>E. coli</i>	Sorbitol +			
DNAsa			<i>S. aureus</i>	Halo rosado			
			<i>S. epidermidis</i>	Halo incoloro			
CHROM-agar Candida			<i>C. albicans</i>	Turquesa			
			<i>C. glabrata</i>	Púrpura			

ANEXO 3: CONTROL DE CALIDAD DE BATERIAS

FECHA			
TM			
MEDIO	CEPA CONTROL	REACCION ESPERADA	RESULTADO

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 107 de 118
		Fecha: enero 2021

TSI	<i>E. coli</i>	Tendido: acidifica (amarillo)	
		Columna: acidifica (amarillo)	
		Gas: positivo (ruptura del agar)	
		H2S: negativo	
	<i>P. mirabilis</i>	Columna: acidifica (amarillo)	
		Gas: positivo (ruptura del agar)	
		H2S: positivo (ennegrecimiento)	
	<i>Ps. Aeruginosa</i>	Tendido: alcaliniza (rojo)	
		Columna: alcaliniza (rojo)	
		Gas: negativo	
		H2S: negativo	
	LIA	<i>E. coli</i>	Columna: púrpura (descarboxilación +)
Gas: positivo			
H2S: negativo			
<i>P. mirabilis</i>		Columna: amarilla	
		Tendido: rojo (deaminación)	
		H2S: positivo	
<i>Shigella spp.</i>		Columna: amarilla (descarboxilación (-))	
		Gas: negativo	
		H2S: negativo	
MIO	<i>E. coli</i>	Movilidad: positiva (columna turbia)	
		Indol: positivo (anillo rojo)	
		Ornitina: positiva (columna púrpura)	
	<i>K. pneumoniae</i>	Movilidad: negativa (desarrollo en picada)	
		Indol: negativo (anillo amarillo)	
		Ornitina: negativa (columna amarilla)	
UREA DE CHRISTENSEN	<i>E. coli</i>	Negativo (no vira)	
	<i>P. mirabilis</i>	Columna y tendido fucsia	
	<i>K. pneumoniae</i>	Tendido fucsia	
CITRATO DE SIMMONS	<i>E. coli</i>	Negativo (no vira)	
	<i>K. pneumoniae</i>	Positivo (vira a azul)	

ANEXO 4: CONTROL DE REACTIVOS Y PRUEBAS BIOQUIMICAS

FECHA	
-------	--

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3
			Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 109 de 118
			Fecha: enero 2021

ESTUFA DE CULTIVO 1				ESTUFA DE CULTIVO 2			
FECHA	HORA	TEMPERATURA	FIRMA	FECHA	HORA	TEMPERATURA	FIRMA

REGISTRO TEMPERATURA CAMARA DE CULTIVO DE KOCH			
FECHA	T° MINIMA	T° MAXIMA	REGISTRADO POR

ANEXO 8: CONTROLES DE KITS REACTIVOS

CONTROLES DE KITS COMERCIAL:				
RESULTADO	FECHA	N° LOTE	RESPONSABLE	OBSERVACIONES

ANEXO 9: REGISTRO CONTROL FUCSINA

FECHA PREPARACION	FECHA CONTROL	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	TM RESPONSABLE

ANEXO 10: CONTROL BACILOSCOPIA

CONTROL BACILOSCOPIA	
REGISTRO INTRA MICROSCOPISTA	
TM	

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3
			Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 110 de 118
			Fecha: enero 2021

N° BACILOSCOPIA	RESULTADO O INFORME	RESULTADO REVISADO	CARACTERÍSTICAS EXTENDIDAS	CARACTERÍSTICAS TINCION	% CONCORDANCIA

CONTROL BACILOSCOPIA				
REGISTRO INTER MICROSCOPISTA				
FECHA	N° BACILOSCOPIA	RESULTADO	OBSERVACIONES	RESPONSABLES

ANEXO 11: LECTURA E INTERPRETACION DE BATERIAS BIOQUIMICAS PARA ENTEROBACTERIAS

LISINA POSITIVA TSI A/A														
TSI	LIA	MIO	MICROORGANISMO	Adonitol	Arabinosa	Citrato de Simmons	DNAsa	Malonato	Oxidasa	Sorbitol	Serología	Urea	V. P.	
A/A, +, -	K/K, +, -	+, +, +	<i>E. coli</i>			1		0		94				
			<i>E. hermanii</i>			1		0		0				
			<i>K. ascorbata</i>			95		96						
			<i>K. cryocrescens</i>			80		86						
A/A, -, -	K/K, -, -	+, +, +	<i>E. coli</i>			1	0		0					
			<i>S. odorifera biogrupo 1</i>			100	100		0					
			BNFE						+					
A/A, +, -	K/K, +, -	-, +, +	<i>E. coli</i>			1		0						

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3	
			Edición: segunda	
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 111 de 118	
			Fecha: enero 2021	

			<i>K. cryocrescens</i>			80		86					
A/A, -, -	K/K, -, -	-, +, +	<i>E. coli</i>			1		0	0				
			<i>Plesiomonas shigelloides</i>						+				
A/A, +, -	K/K, +, -	+, -, +	<i>E. aerogenes</i>	98	10		0					2	98
			<i>E. gergoviae</i>	0	99		0					93	100
			<i>H. alvei</i>	0	95		0					4	85
			<i>K. ascorbata</i>	0	10		0					0	0
			<i>K. cryocrescens</i>	0	10		0					0	0
			<i>S. liquefaciens</i>	5	98		85					3	93
			<i>S. marcescens</i>	40	0		98					15	98
A/A, -, -	K/K, -, -	+, -, +	<i>S. liquefaciens</i>		98		85						
			<i>S. marcescens</i>		0		98						
			<i>S. odorifera biogrupo 1</i>		10		10						
A/A, +, +	K/K, +, +	+, -, +	<i>Salmonella subgrupo 3 (Arizona)</i>					95			+		
A/A, +, -	K/K, +, -	-, -, +	<i>E. gergoviae</i>									93	100
			<i>H. alvei</i>								4	85	
			<i>K. cryocrescens</i>								0	0	
A/A, -, -	K/K, -, -	-, -, +	<i>E. coli inactivo</i>		85		0						
			<i>S. marcescens biogrupo 1</i>		0		82						

A/A, +, -	K/K, -, -	-, -, -	<i>K. ozaenae</i>				0					10	0
			<i>K. pneumoniae</i>				0					95	98
			<i>S. rubidaea</i>				99					2	100
A/A, -, -	K/K, -, -	-, -, -	<i>E. coli inactivo</i>	3			0	0					0
			<i>K. ozaenae</i>	97			0	3					0
			<i>S. marcescens biogrupo 1</i>	30			82	0					60
			<i>S. rubidaea</i>	99			98	94					100

LISINA POSITIVA TSI A/A

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Edición: segunda
			Página 112 de 118
			Fecha: enero 2021

TSI	LIA	MIO	MICROORGANISMO	Adonitol	Arabinosa	Citrato de Simmons	DNAsa	Malonato	Oxidasa	Sorbitol	Serología	Urea	V. P.
A/A, +, -	K/K, +, -	+, +, -	<i>E. coli</i>			1	0		0				
			<i>S. odorifera biogrupo 2</i>			97	100		0				
			<i>Aeromonas spp.</i>							+			
A/A, -, -	K/K, -, -	+, +, -	<i>E. coli</i>			1	0		0				
			<i>S. odorifera biogrupo 2</i>			97	100		0				
			<i>Aeromonas spp.</i>							+			
A/A, +, -	K/K, +, -	+, -, -	<i>E. vulneris</i>				0	85	0				
			<i>S. rubidaea</i>				99	94	0				
			<i>S. odorifera biogrupo 2</i>				100	0	0				
			<i>Aeromonas spp.</i>							+			
A/A, -, -	K/K, -, -	+, -, -	<i>S. marcescens biogrupo 1</i>		0		82	0	0				
			<i>S. odorifera biogrupo 2</i>		100		100	0	0				
			<i>S. rubidaea</i>		100		99	94	0				
			<i>Aeromonas spp.</i>							+			
A/A, +, -	K/K, +, -	-, +, -	<i>E. coli</i>			1						1	
			<i>K. oxytoca</i>			95							90
A/A, -, -	K/K, -, -	-, +, -	<i>E. coli</i>			1						1	

LISINA POSITIVA TSI K/A

TSI	LIA	MIO	MICROORGANISMO	Adonitol	Arabinosa	Citrato de Simmons	DNAsa	Malonato	ONPG	Oxidasa	Pigmento	Sorbitol	Serología	Urea
K/A, +, +	K/K, +, +	+, +, +	<i>E. tarda</i>	0	9	1			0			0		
K/A, +, -	K/K, +, -	+, +, +	<i>E. coli</i>	5								94		
			<i>E. hermanii</i>	0							98	0		
			<i>E. fergusonii</i>	98								0		
K/A, -, -	K/K, -, -	+, +, +	<i>E. coli</i>	5			0			0		94		
			<i>E. fergusonii</i>	98			0			0		0		
			<i>S. odorifera biogrupo 1</i>	50			100			0		100		
			<i>Plesiomonas shigelloides</i>								+			
K/A, +, -	K/K, +, -	-, +, +	<i>E. coli</i>	5								94		1
			<i>E. fergusonii</i>	98								0		0

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3
			Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 114 de 118
			Fecha: enero 2021

K/A, +, -	K/K, +, -	+, +, -	<i>E. coli</i>			1				0				1
			<i>Aeromonas spp.</i>							+				
K/A, -, -	K/K, -, -	+, +, -	<i>E. coli</i>			1				0				1
			<i>Aeromonas spp.</i>							+				

SINA NEGATIVA TSI A/A															
TSI	LIA	MIO	MICROORGANISMO	Adonito I	Arabi no sa	Argi nin a dihi drol asa	Cit rat o de Si m mon s	D N As a 25 °C	Ma lo na to	Ox id asa	Pi g men to a ma ri llo	So rbi tol	Ur ea	V. P.	
A/A, +, -	K/A, +, -	+, +, +	<i>C. amalonaticus</i>	0			85						80	0	
			<i>C. diversus</i>	98			99						75	0	
			<i>E. sakazakii</i>	0			99				98		1	100	
			<i>E. coli</i>	5			1				0	94	1	0	
			<i>E. hermanii</i>	0			1				98	0	0	0	
			<i>K. cryocrescens</i>	0			80						0	0	
A/A, -, -	K/A, -, -	+, +, +	<i>E. coli</i>				1					1			
A/A, -, -	K/A, -, - A/A*	-, +, +	<i>E. coli</i>							0			1		
			<i>Y. enterocolitica</i> *							0			75		
			<i>Y. frederiksenii</i> *								0			70	
			<i>Y. intermedia</i> *								0			80	
			<i>Pasteurella multocida</i>								+				
A/A, +, -	K/A, +, - A/A*	-, +, +	<i>E. coli</i>				1		0				1	0	
			<i>E. sakazakii</i>				99		18		98		1	100	
			<i>K. cryocrescens</i>				80		86				0	0	
			<i>Y. frederiksenii</i> *				15		0				70	0	
			<i>Y. intermedia</i> *				5		5				80	5	
A/A, +, +	K/A, +, +	+, -, +	<i>C. freundii</i>				95								

A/A, +, -	K/A, +, -	+, -, +	<i>C. davisae</i>		0	50						0	0	50
			<i>C. freundii</i>		10	65						98	70	0
			<i>E. cloacae</i>		10	97						95	65	100
			<i>E. gergoviae</i>		99	0						0	93	100

 HOSPITAL CLAUDIO VICUÑA SAN ANTONIO	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Edición: segunda
			Página 115 de 118
			Fecha: enero 2021

			<i>E. sakazakii</i>		100	99					98	0	1	100
			<i>K. cryocrescens</i>		100	0						45	0	0
A/A, -, -	K/A, -, -	+, -, +	<i>C. davisae</i>					0						
			<i>S. marcescens biogrupo 1</i>					82						
A/A, -, -	K/A, -, - A/A*	-, -, +	<i>S. marcescens biogrupo 1</i>		0			82					0	
			<i>E. coli</i>		85			0					1	
			<i>Y. enterocolitica*</i>		98			5					75	
A/A, +, -	K/A, +, -	-, -, +	<i>E. cloacae</i>			97							95	65
			<i>E. gergoviae</i>			0							93	100
			<i>K. cryocrescens</i>			0							0	0

LISINA NEGATIVA TSI A/A

TSI	LIA	MIO	MICROORGANISMO	Adonitol	Ara binosa	Arginina dihidrolasa	Citrato de Símmons	DNAs a 25°C	Malonato	Oxidasa	Pigmento amarillo	Sorbitol	Urea	V. P.
A/A, -, -	K/A, -, -	-, -, -	<i>E. agglomerans</i>	7	95		50	0	65		75			
			<i>E. americana</i>	0	0		95	0	0					
			<i>E. coli inactivo</i>	3	85		1	0	0					
			<i>K. rhinoscleromatis</i>	100	100		0	0	95					
			<i>K. ozaenae</i>	97	98		30	0	3					
			<i>S. marcescens biogrupo 1</i>	30	0		30	82	0					
			<i>S. rubidaea</i>	99	100		95	99	94					
			<i>T. tyseos</i>	0	0		2	0	0					
A/A, +, -	K/A, +, -	-, -, -	<i>E. agglomerans</i>	7				0	65					
			<i>K. ozaenae</i>	97				0	3					
			<i>S. rubidaea</i>	99				99	94					
A/A, +, -	K/A, +, -	+, +, -	<i>E. agglomerans</i>			0	50	0	65	0	75	50		70
			<i>E. sakazakii</i>			99	99	0	18	0	98	0		100
			<i>E. coli</i>			17	1	0	0	0	0	94		0
			<i>S. odorifera biogrupo 2</i>			0	97	100	0	0	0	100		100
			<i>Aeromonas spp.</i>								+			
A/A, -, -	K/A, -, -	+, +, -	<i>E. agglomerans</i>				50	0	65	0	75	30		70
			<i>E. coli</i>				1	0	0	0	0	94		0
			<i>S. odorifera biogrupo 2</i>					100		0	0			100
			<i>BFNE</i>								+			

	Hospital Claudio Vicuña		Código: APL 1.3	
			Edición: segunda	
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología		Página 116 de 118	
			Fecha: enero 2021	

A/A, +, -	K/A, +, -	+, -, -	<i>C. neteri</i>		0	100		0		0		100	0	50
			<i>C. freundii</i>		100	65		0		0		98	70	0
			<i>E. agglomerans</i>		95	0		0		0	75	30	20	70
			<i>E. sakazakii</i>		100	99		0		0	98	0	1	100
			<i>E. vulneris</i>		100	30		0		0	50	1	0	0
			<i>S. rubidaea</i>		100	0		99		0		1	2	100
			<i>S. odorifera biogrupo 2</i>		100	0		100		0		100	0	100
			<i>Aeromonas spp.</i>							+				
A/A, -, -	K/A, -, -	+, -, -	<i>E. agglomerans</i>	7	95			0		0	75	30		
			<i>E. americana</i>	0	0			0		0		0		
			<i>S. marcescens biogrupo 1</i>	30	0			82		0		92		
			<i>S. rubidaea</i>	59	100			99		0		1		
			<i>S. odorifera biogrupo 2</i>	55	100			100		0		100		
			<i>BFNE</i>							+				
A/A, +, +	K/A, +, +	+, -, -	<i>C. freundii</i>				95							
A/A, -, -	K/A, -, -	-, +, -	<i>E. agglomerans</i>				50		65	0	75	30		70
			<i>E. coli</i>				1		0	0	0	94		0
			<i>Pasteurella multocida</i>								+			
A/A, +, -	K/A, +, -	-, +, -	<i>E. agglomerans</i>				50		65		75	30		70
			<i>E. coli</i>				1		0		0	94		0

LISINA NEGATIVA TSI K/A

TSI	LIA	MIO	MICROORGANISMO	Adonitol	Arabinosa	Citrato de Simons	DNSa	Fenilalanina	Malonato	Manitol	ONPG	Oxidasa	Pigmento	Sacrosa	V.P.	Sorbitol	Urea	Serología
K/A, -, +	K/A, -, +	-, -, -	<i>S. gallinarum</i>															+
K/A, +, -	K/A, +, -	+, +, -	<i>E. agglomerans</i>			50			65			0	75			30	20	
			<i>E. coli</i>			1			0							94	1	
			<i>Aeromonas spp.</i>										+					
K/A, -, -	K/A, -, -	+, +, -	<i>E. agglomerans</i>			50			65			0	75			30	20	
			<i>E. coli</i>			1			0							94	1	
			<i>BFNE</i>										+					
K/A, +, -	K/A, +, -	-, +, -	<i>E. agglomerans</i>			50			65				75			30	20	
			<i>E. coli</i>			1			0							94	1	
K/A, -, -	K/A, -, -	-, +, -	<i>E. agglomerans</i>			50			65							30	20	
			<i>E. coli</i>			1			0							94	1	
			<i>Shigella serogrupo A, B y C</i>			0			0								30	0

	Hospital Claudio Vicuña	Código: APL 1.3
		Edición: segunda
	Manual de procedimientos técnicos y control de calidad microbiología	Página 118 de 118
		Fecha: enero 2021

2° signo después de TSI o LIA: H₂S

*: Crecimiento lento

** : Anillo de H₂S

Números: cada número da el porcentaje de reacciones positivas hasta las 48 horas de incubación a 35-37 °C. La mayoría de las reacciones positivas se producen a las 24 horas. No se consideró la reacción después de las 48 horas.

ANEXO 12: LECTURA E INTERPRETACIÓN DE BATERIAS BIOQUÍMICAS PARA *Vibrio spp.*

	<i>V. cholerae</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
TSI	A/A, -, -	K/A, -, -
LIA	K/K, -, -	K/K, -, -
MIO	+, +, +	+, -, +
Citrato	+	-
Urea	-	-

ANEXO 13: CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS DE LAS ESPECIES LEVADURIFORMES EN CHROM-agar CANDIDA.

ESPECIE	COLOR	ASPECTO
<i>Candida albicans</i>	Verde esmeralda	Lisas, brillantes
<i>Candida glabrata</i>	Rosa oscuro	Lisas, brillantes
<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa, rosa pálido	Planas, brillantes, borde liso
<i>Candida krusei</i>	Rosa	Secas, opacas, rugosas
<i>Candida parapsilopsis</i>	Rosa pálido	Lisas, brillantes
<i>Candida tropicalis</i>	Azul	Lisas, con borde micelial
<i>Geotrichum candidum</i>	Blanca	Aterciopelada
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Rojo coral	Lisas, húmedas, mucosas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Púrpura, rosa púrpura	Lisas, planas, húmedas
<i>Trichosporon beigelii</i>	Azul intenso	Secas, rugosas

14. Formulario de Control de Cambios

Número de edición	Cambios	Fecha	Firma