




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101. Tel: 8-26-23-00 ext. 6591
San Luis Potosí, S.L.P., México.

El fondo de la portada está dividido en cuatro cuadrantes. El cuadrante superior izquierdo muestra un petri dish con varias colonias bacterianas blancas. El cuadrante superior derecho muestra una imagen microscópica de bacterias de forma bacilar. El cuadrante inferior izquierdo muestra una imagen microscópica de bacterias de forma bacilar de color rojo. El cuadrante inferior derecho muestra una imagen microscópica de una bacteria esférica con flagelos.

BACTERIOLOGÍA CLÍNICA

MANUAL DE

LABORATORIO

Alumno(a): _____ Hora: _____

Maestro(a): _____

2018 - 2019

Aprobado por el H. Consejo Técnico Consultivo. 20 de septiembre de 2013

MANUAL ELABORADO POR:

ME. Juana Tovar Oviedo

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez

COLABORADORES:

Dra. María Eugenia Torre Bouscoulet

QFB. Gloria Alejandra Martínez Tovar

QFB. Andrés Flores Santos

2018 - 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Av. Dr. Manuel Nava No. 6, Edificio M-101. Tel: 8-26-23-00 ext. 6591
San Luis Potosí, S.L.P., México.



CARRERA DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRÁCTICA 2

MANEJO Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

REQUISITOS TEÓRICOS

El alumno debe conocer:

1. Biota nativa y patógena del hombre en los diferentes sitios anatómicos.
2. La recolección, conservación y transporte de especímenes comunes.
3. Generalidades sobre Anatomía y Fisiología del cuerpo humano.

OBJETIVO GENERAL

- El alumno efectuara algunos procedimientos de toma, conservación, transporte y procesamiento de algunos especímenes biológicos para estudios microbiológicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- El alumno desarrollará los criterios necesarios para la obtención, recibo o rechazo de las muestras para estudios microbiológicos.
- Diseñará las bases para la toma apropiada de especímenes clínicos lo que conducirá a estudios microbiológicos confiables.

INTRODUCCIÓN

Es de trascendental importancia recolectar apropiadamente un espécimen clínico para poder ofrecer estudios microbiológicos completos, confiables y oportunos en la fase temprana de la enfermedad infecciosa.

La formación de equipos de vigilancia epidemiológica nosocomiales debe incluir a Médicos Infectólogos, Enfermeras, Epidemiólogos, Químicos Microbiólogos y todo el personal involucrado en el manejo de especímenes biológicos, en

comunicación constante, para un óptimo funcionamiento del laboratorio y de los sistemas de control de calidad.

GENERALIDADES EN LA TOMA DE MUESTRAS

1. Seleccionar el sitio anatómico correcto y obtener un espécimen representativo.
2. Colectar el espécimen empleando una técnica apropiada.
3. Colocar el espécimen en un sistema de transporte adecuado, que promueva el desarrollo del agente etiológico de la enfermedad y suprima los microorganismos contaminantes.
4. Transportar la muestra al laboratorio y mantenerla en condiciones de temperatura y humedad que no dañen a los microorganismos responsables de la enfermedad.
5. Establecer periodos óptimos para la recolección de muestras, a fin de tener la mejor oportunidad para aislar los microorganismos causantes de la patología.
6. Cuando sea posible obtener la muestra antes de la administración de antibióticos.
7. El rotulado adecuado de los especímenes debe incluir la siguiente información:
 - 1) Nombre del paciente, edad, número de sala o dirección de paciente.
 - 2) Nombre del médico tratante.
 - 3) Fecha y hora de colección de la muestra o espécimen.
 - 4) Sitio anatómico del cual fue colectado el espécimen (tipo I, II o III).
 - 5) Procedimientos especiales usados para colectar el espécimen.
 - 6) En caso de que el paciente este recibiendo antibiótico, nombre o nombres de los mismos.
 - 7) Resumen de los informes epidemiológicos y clínicos (expediente).

TIPOS DE ESPECIMENES

Tipo 1. Son especímenes que se obtienen de sitios con biota normal, como la piel y las membranas mucosas.

Tipo 2. Son muestras que provienen de sitios estériles pero que para colectarse pasan por sitios con biota normal.

Tipo 3. El espécimen proviene de sitios estériles y se emplean técnicas invasivas para su recolección.

RECOLECCIÓN DE ESPECIMENES

1ª. SESIÓN

Actividades:

- 1.- Toma del espécimen de exudado faríngeo en forma demostrativa
- 2.- Evaluar laminillas de muestras de esputo teñidas con Gram en 10X

EXUDADO FARÍNGEO (Diagrama 2.a)

1. Recolectar con un hisopo estéril y con ayuda de un abatelenguas la muestra de la faringe posterior sin tocar otras estructuras anatómicas.
2. Inocular inmediatamente o bien colocar el hisopo en un medio de transporte.

ESPUTO (Diagrama 2.b)

Consideraciones generales:

1. Se prefiere que el espécimen sea colectado temprano en la mañana al incorporarse, para aumentar las posibilidades de recuperar al patógeno, ya que las secreciones se acumulan durante la noche.
2. En un recipiente de boca ancha estéril, colectar el espécimen directamente.
3. Refrigerar la muestra solo si los microorganismos buscados son micobacterias u hongos, si se sospecha de etiología bacteriana, mantener a temperatura ambiente y sembrar inmediatamente o en un tiempo no mayor de dos horas.

Figura 2. Valoración de muestras de esputo en tinción de Gram en resolución de 10X

		CELULAS EPITELIALES					
CELULAS POR CAMPO		0	1 - 9	10 - 24	> 25		
REPORTE		NINGUNA	POCAS	MODERADAS	MUCHAS		
VALOR DE Q		0	-1	-2	-3		
NEUTROFILOS	0	NINGUNA	0	0	-1	-2	-3
	1 - 9	POCAS	+1	+1	0	-1	-2
	10 - 24	MODERADAS	+2	+2	+1	0	-1
	> 25	MUCHAS	+3	+3	+2	+1	0

Q= 0, la secreción de esputo no es representativa de vías respiratorias bajas, no cultivar.

Q=1, 2, si se requiere cultivo de anaerobios el reporte debe de indicar: evidencia de contaminación superficial.

Q=3, Muestra ideal para cultivo de aerobios y anaerobios

2ª. SESIÓN

Actividades:

- 1.- Evaluar sedimentos urinarios
- 2.- Realizar siembra de la muestra de orina obtenida por chorro medio (personal).

TRACTO URINARIO (Diagrama 2.c)

Instrucciones para la recolección de la orina en mujeres

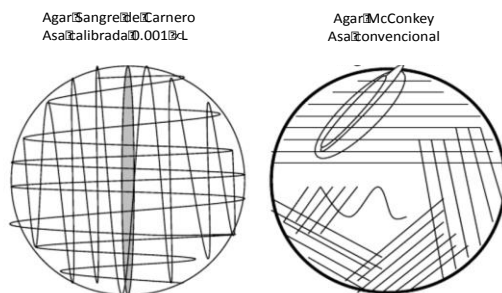
1. Sentarse en forma cómoda en el W.C.
2. Lavar la zona periuretral de adelante hacia atrás con agua y jabón o solución salina estéril.
3. Separando los labios menores con el dedo índice y pulgar de la mano izquierda y descartar la primera porción de orina al WC.
4. Recolectar de chorro medio la orina en un recipiente estéril de boca ancha y llevarlo al laboratorio.
5. Todas las orinas deben ser refrigeradas si no son cultivadas en un lapso de 30 minutos a partir de la toma de muestra. Las orinas de pacientes con sonda **NO SE CULTIVAN**.

Instrucciones para pacientes pediátricos

1. Lavar la región periuretral antes de colectar la muestra
2. Colocar la bolsa estéril pediátrica evitando poner pañal al paciente
3. En cuanto la muestra sea colectada llevarla al laboratorio para su análisis
4. Procesar la muestra inmediatamente para evitar contaminación

Sembrar en ASC (con el asa calibrada de 0.001 μ L), para practicar la cuenta total de los microorganismos y en AMC siembra por agotamiento para aislar los Gram negativos, según se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Técnicas de siembra de muestra de urocultivo.



3ª. SESIÓN

Actividades:

- 1.- Interpretación de resultados del urocultivo
- 2.- Manejo adecuado de los modelos anatómicos para la colecta de los especímenes del tracto genital masculino y femenino.
- 3.- Observación de laminillas de muestras del tracto genital para la familiarización de la morfología y estandarización del reporte.

EXUDADOS DEL TRACTO GENITAL FEMENINO Y MASCULINO (Diagrama 2.d)

Las infecciones del tracto genital femenino (ITGF) son usualmente divididas en dos:

- Tracto bajo (vulva, vagina y cérvix)
- Tracto alto (útero, trompas de Falopio, ovarios y cavidad abdominal)

TIPOS DE ESPECIMENES Y COLECCIÓN

La selección de un espécimen apropiado para el diagnóstico de ITGF depende del sitio de infección y del organismo esperado. En el tracto genital bajo existen infecciones clínicamente indistinguibles causadas por un gran número de microorganismos que requieren técnicas específicas de colección y aislamiento. La comunicación activa entre el médico y el químico va a facilitar el procesamiento de un espécimen apropiado, ya que el laboratorio no debe examinar de rutina cada espécimen de tracto genital con biota normal predominante.

Recolección del espécimen del tracto genital femenino (Diagrama 2.e):

1. Secreción vulvar. En niñas o mujeres que no han tenido actividad sexual. El espécimen se recolecta de la región vulvar con la ayuda de dos hisopos estériles. el primero se empleará en la preparación del frotis. El segundo hisopo se transporta en medio de Stuart para realizar el cultivo.
2. Secreción cervico-vaginal. Se recolecta de mujeres con actividad sexual, apoyándose en el empleo del espejo vaginal para poder visualizar el cérvix.
3. Secreción vaginal. Para la búsqueda de *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* y levaduras.

Puede emplearse un medio de transporte, cuyas características dependen de la etiología probable. Es importante considerar que *Haemophilus ducreyi* no tiene resistencia a ser transportado por lo que las muestras deben ser inoculadas en medios de aislamiento primario inmediatamente.

Observar laminillas de muestras vaginales proporcionadas por el maestro teñidas por la técnica de Gram, realizar la valoración según la Figura 4 y establecer el diagnóstico, considerando la puntuación obtenida, en donde un puntaje de 0 a 3 es considerado normal, de 4 a 6 es intermedio y de 7 a 10 es indicador de vaginitis bacteriana.

Figura 4. Diagnóstico de vaginitis bacteriana usando la tinción de Gram

Morfortipos	Número de morfotipos observados por campo en objetivo de 100 X					Puntuación
	Ninguno	≤ 1	1-5	5-30	>30	
<i>Lactobacillus</i>	4	3	2	1	0	_____
<i>Gardnerella / Bacteroides</i>	0	1	2	3	4	_____
Bacilos curvos Gram variables	0	1	2	3	4	_____
Puntuación total						_____

Adaptado de Nugent, R P. 1991. ²

Recolección de tracto genito-urinario masculino

Exudado uretral: Se requiere de dos hisopos finos, que puedan ser insertados en la uretra distal masculina (El hisopo debe permanecer en la uretra por aproximadamente 10 segundos). El primer hisopo se emplea para preparar el frotis. El segundo hisopo se transporta en medio de Stuart para realizar el cultivo

Uretritis.- La presencia de leucocitos es característica de muchos trastornos del tracto urinario inferior masculino. Un ejemplo claro es la uretritis gonocócica y la originada por *Chlamydia sp.*, en la que es evidente la descarga purulenta uretral repleta de cocos Gram negativos en pares dentro de leucocitos polimorfonucleares en el caso de la infección por *Neisseria gonorrhoeae*, la muestra uretral debe de recolectarse con un hisopo de dacrón.

Prostatitis.- Se ha estimado que el 50% de los hombres presentan prostatitis en algún momento de su vida. Es de importancia crítica diferenciar a los pacientes con síntomas del tracto urinario inferior asociado con bacteriuria, de los que pueden tener una prostatitis bacteriana.

Epididimitis.- Se puede dividir en:

1. Bacteriana inespecífica.- La forma mas común en hombres mayores de 35 años es la infección por coliformes o *Pseudomonas sp.* y en forma eventual los cocos Gram positivos.
2. De transmisión sexual.- Es el tipo más común de epididimitis en hombres jóvenes sexualmente activos. *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* son los patógenos más comunes.

Orquitis.- En este trastorno poco común, la diseminación sanguínea es la vía general de acceso y los virus son los patógenos principales (parotiditis epidémica). Generalmente el diagnóstico es clínico.

1ª. SESIÓN

Actividades:

1.- Realización de la colecta de la superficie de la piel antes y después de la desinfección

2.- Recolección de la muestra sanguínea

MUESTRAS DE SANGRE (Diagrama 2.f)

Preparación de la piel para toma de muestra para hemocultivo.

1. Después de la palpación del sitio de venopunción, aplicar una solución de isodine (tintura de yodo del 1 al 2%).
2. Limpiar la piel con alcohol al 70%, por un mínimo de 30 seg.
3. Aplicar nuevamente una solución de isodine (tintura de yodo del 1 al 2%).

Venopuntura e inoculación de las botellas

1. Retirar el yodo de la piel con una torunda con alcohol.
2. Obtener 20 o 30 mL de sangre en adultos, según el sistema de medios.
3. Cambiar la aguja antes de inocular la sangre en la botella o desechar 2-3 gotas.
4. Una vez inoculada la muestra, mezclar la botella por inversión e incubar.
5. Checar el número y tiempo del cultivo.

Relación de sangre y medio de cultivo (factor de dilución). Es recomendable una relación final entre 1:5 a 1:10 (vol/vol). La sangre humana contiene una serie de factores que pueden inhibir el desarrollo de microorganismos. La dilución de la sangre disminuye la concentración de esas sustancias a niveles subinhibitorios.

Es importante que se tomen simultáneamente de diversos sitios anatómicos las muestras de sangre para los hemocultivos antes de la administración de antibióticos, si no es posible, colectar la muestra en el pico febril.

Examinar las botellas diariamente buscando signos visibles de desarrollo bacteriano.

Practicar un subcultivo a las 6h y a las 18h de incubación y luego subcultivar cada 48h por un total de 30 días.

2ª. SESIÓN

Actividades:

- 1.- Interpretación de los cultivos previos
- 2.- Explicar la técnica de toma de muestras de piel
- 3.- Ejemplificar como se siembra una punta de Catéter venoso central

MUESTRAS DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS

Las lesiones del tejido cutáneo o relacionado a sus anexos son las siguientes:

Absceso. (Diagrama 2.i)

Lesión repleta de pus en los tejidos, la muestra se toma por punción.

Chancro. Lesión ulcerosa que se forma en el sitio de inoculación microbiana. El espécimen se recolecta después de la asepsia correspondiente con la ayuda de una pipeta Pasteur de la lesión después de irritarla con éter.

Escara. Herida o ulcera en etapa cicatrizal. Para coleccionar una muestra de este tipo es necesario retirar la escara (costra) con una pinza estéril previa asepsia.

Fístula. Comunicación anormal entre dos tejidos, generalmente consecutivo a un proceso de ulceración, que comunica el foco de infección con otro órgano o estructura interno o externo, por el cual fluye pus o líquido normal desviado de un trayecto ordinario. La muestra se toma con la ayuda de una jeringa del fondo de la lesión.

Mácula. Consiste en una mancha casi siempre roja de dimensiones variables que no eleva la piel. La toma de muestra requiere la descontaminación de la lesión y la recolección de un raspado de la misma.

Pápula. En una elevación eruptiva pequeña, sólida y circunscrita que ordinariamente termina en descamación. El espécimen se toma igual que el anterior.

Vesícula. Vejiga cutánea pequeña formada por la elevación circunscrita de la epidermis, llena de líquido seroso. La muestra se toma por punción pasando por piel sana.

Pústula. Lesión cutánea cerrada cuyo contenido es purulento. El espécimen se toma igual que el anterior.

Ulcera. Lesión erosionada de la piel, con escasa o nula tendencia a la cicatrización. La muestra se toma del fondo de la lesión con la ayuda de una jeringa y de no ser esto posible, con la ayuda de un hisopo.

La superficie de herida y úlceras decubitales está frecuentemente colonizadas por bacterias del medio ambiente. Por esta razón el método más aconsejable para recoger las muestras cutáneas es por aspiración del material purulento localizado en las profundidades de la herida, siempre y cuando esto sea posible. Las muestras deben ser inoculadas en ASC, Mac conkey, agar chocolate y caldo tioglicolato y en todos los casos debe practicarse una tinción de Gram para observar la morfología microbiana del agente etiológico.

MUESTRA DE CATÉTER VENOSO CENTRAL (Diagrama 2.g)

Los catéteres venosos centrales son una herramienta de incuestionable valor en el tratamiento de los pacientes que necesitan accesos vasculares para recibir fármacos, nutrición parenteral o ser monitorizados hemodinámicamente, entre otras indicaciones. Sin embargo, a pesar de su utilidad, su uso no está exento de posibles complicaciones, mecánicas e infecciosas, de las que la infección asociada a catéter (IAC) es la más importante complicación asociada a su uso, esto incluye la formación de biopelículas en estos dispositivos.

Para la determinación de la IAC, se utiliza el método semicuantitativo de Maki, que consiste en el cultivo del extremo terminal (la punta del catéter de 3-5 cm) en agar

sangre de carnero, para su posterior incubación por 24 h a 37°C, posterior a ello la evaluación del cultivo permite diferenciar entre infección (recuento superior a 15 UFC) o simple colonización (recuento menor a 15 UFC).

3ª. SESIÓN

Actividades:

1.- Preparación

MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDEO (Diagrama 4.j)

La punción lumbar debe practicarse siempre que sea evidente el síndrome meníngeo a menos que sea probable un enclavamiento sobre el bulbo. Este espécimen, por su naturaleza, es colectado por el clínico.

Será necesaria solo una punción lumbar (entre la 3ª y 4ª vértebra lumbar), excepto en el caso que la presencia de células polimorfo nucleares tempranas (p Ej. Meningitis tuberculosa) haga necesaria una segunda punción.

El líquido requerido así como su cantidad es la siguiente:

- ↪ Examen bioquímico 1 mL
- ↪ Estudio celular 1 mL
- ↪ Examen microbiológico 3-4 mL

OTROS LÍQUIDOS:

- ↪ **LÍQUIDO ASCITIS Y DIÁLISIS (Diagrama 2.k)**
- ↪ **LÍQUIDO PLEURAL (Diagrama 2.l)**
- ↪ **LÍQUIDO PERICÁRDIO (Diagrama 2.m)**
- ↪ **LÍQUIDO SINOVIAL (Diagrama 2.n)**

4ª. SESIÓN

Actividades:

- 1.- Observación de la tinción de Citología de moco fecal

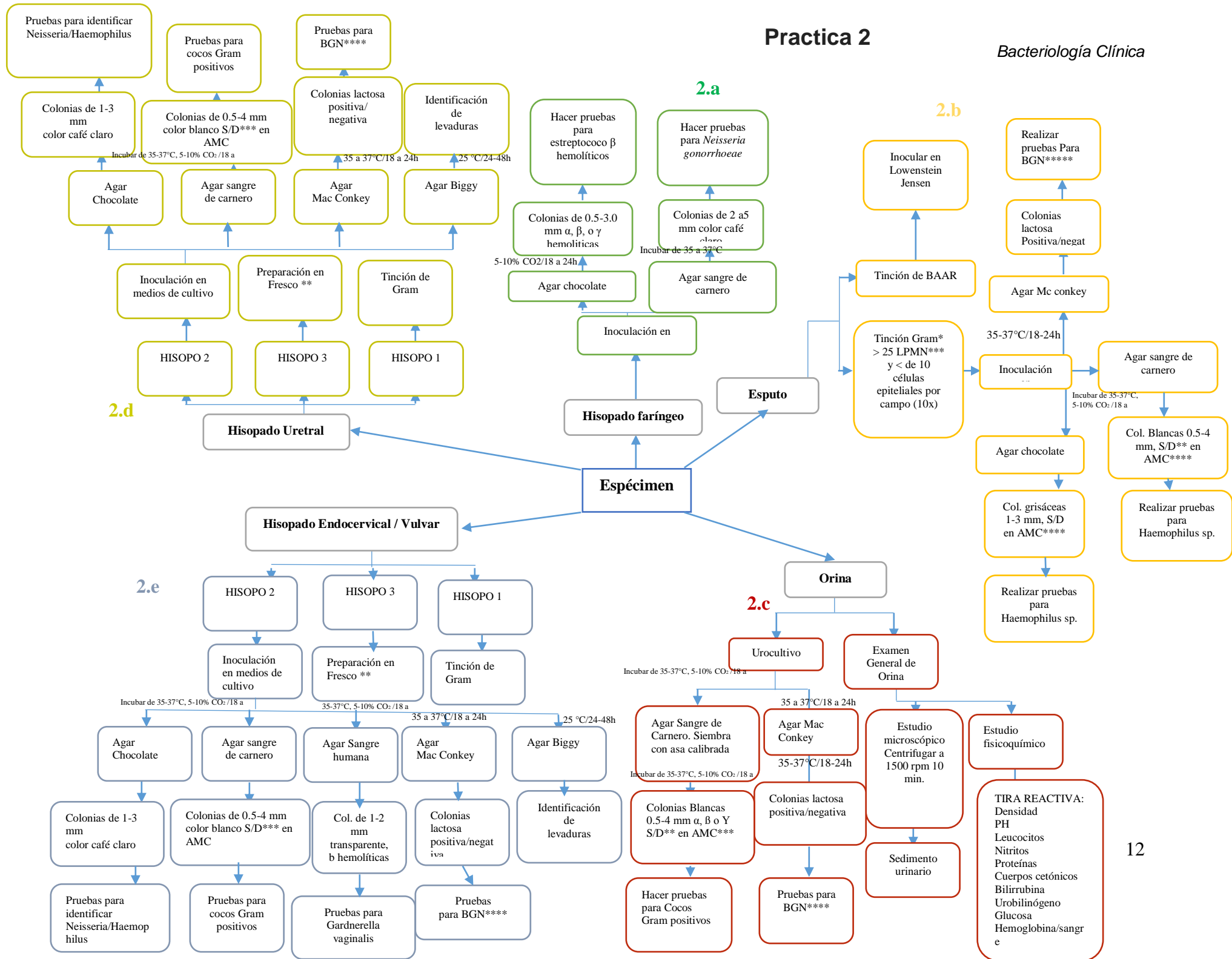
MUESTRAS DE HECES (Diagrama 2.o)

El espécimen debe colectarse durante la fase aguda de la enfermedad. Las muestras mas comúnmente referidas al laboratorio son heces e hisopados rectales, sin embargo también pueden recibirse hisopos de lesiones rectales tomadas mediante sigmoidoscopia, muestras de vómito, contenido duodenal, sangre, líquido peritoneal, etc.

Para colectarlas es necesario emplear recipientes limpios, e hisopos flexibles estériles. Deben procesarse en un tiempo no mayor de 2 h. Los hisopos en Cary Blair permite conservar las muestras por tiempos mas prolongados, las muestras deben refrigerarse si no se procesan rápidamente. Solo se necesitan 0.5 a 2 g de heces para un coprocultivo e inocular las muestras según la etiología esperada como se menciona en la práctica de coprocultivo.

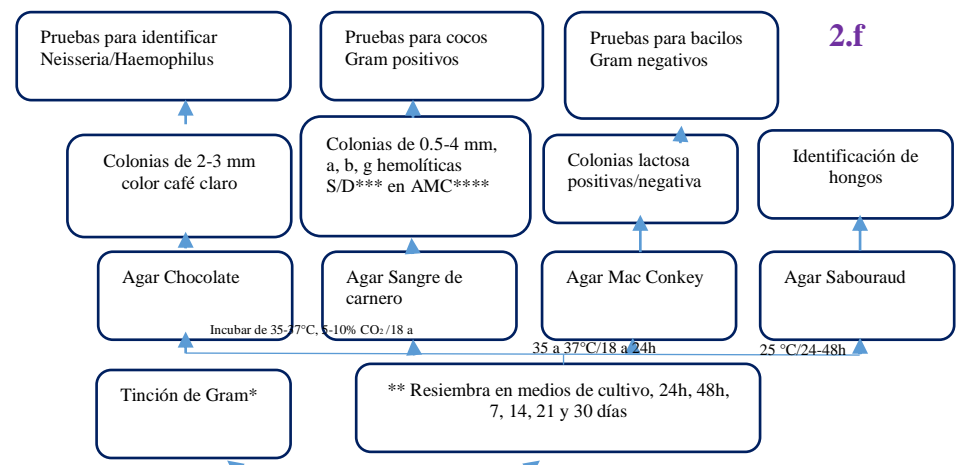
Practica 2

Bacteriología Clínica



Bacteriología Clínica

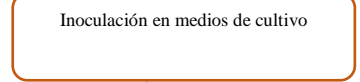
2.f



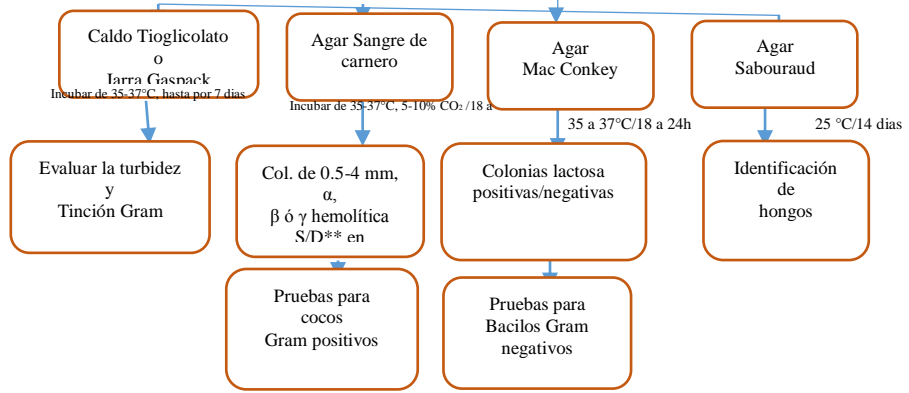
Espécimen



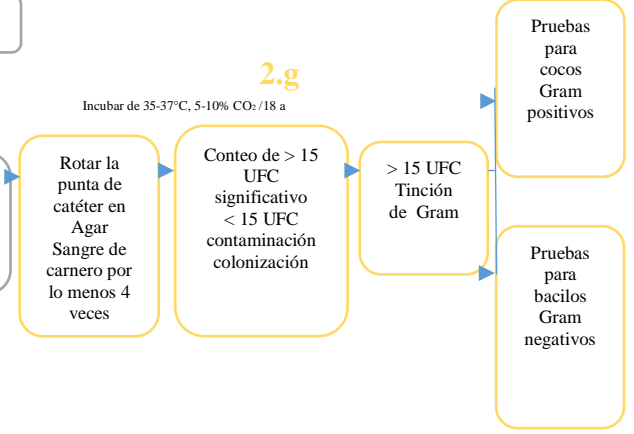
Absceso



2.i

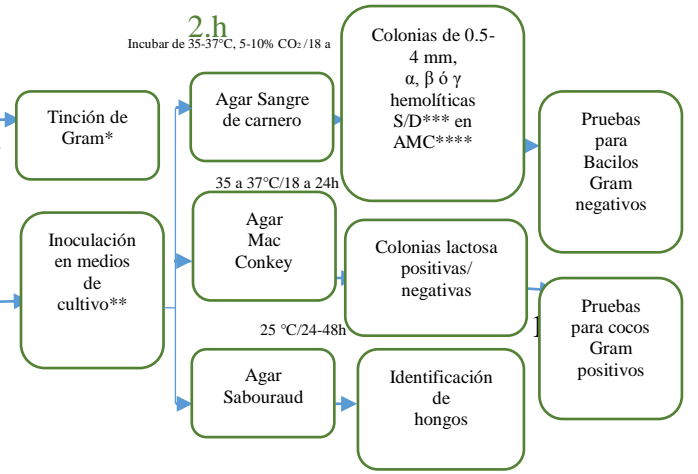


Punta de catéter de 3-5 cm.

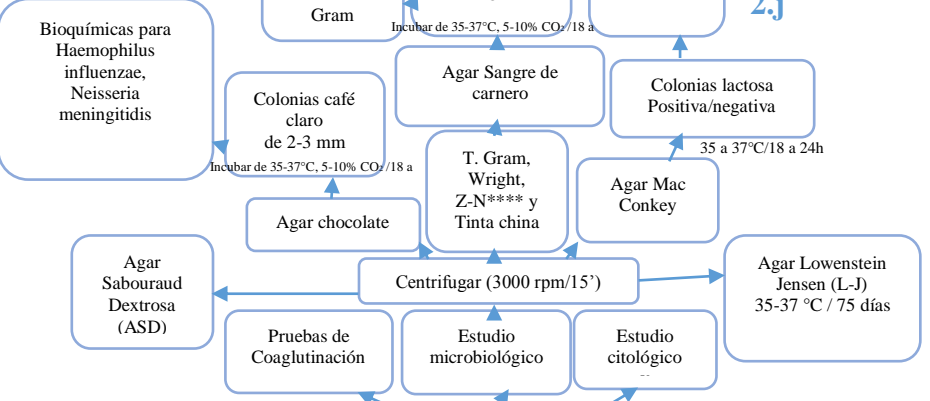


2.g

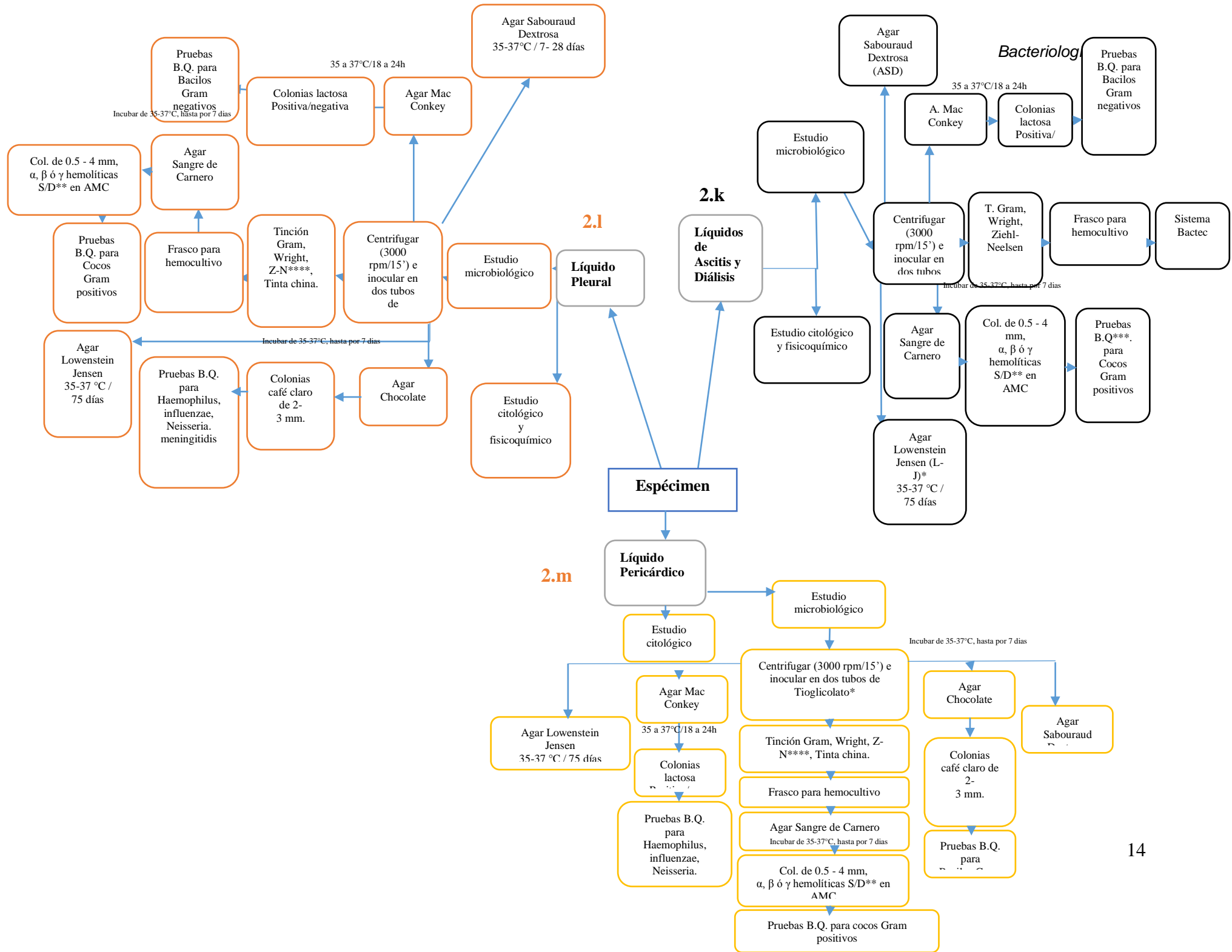
Hisopado de herida abierta

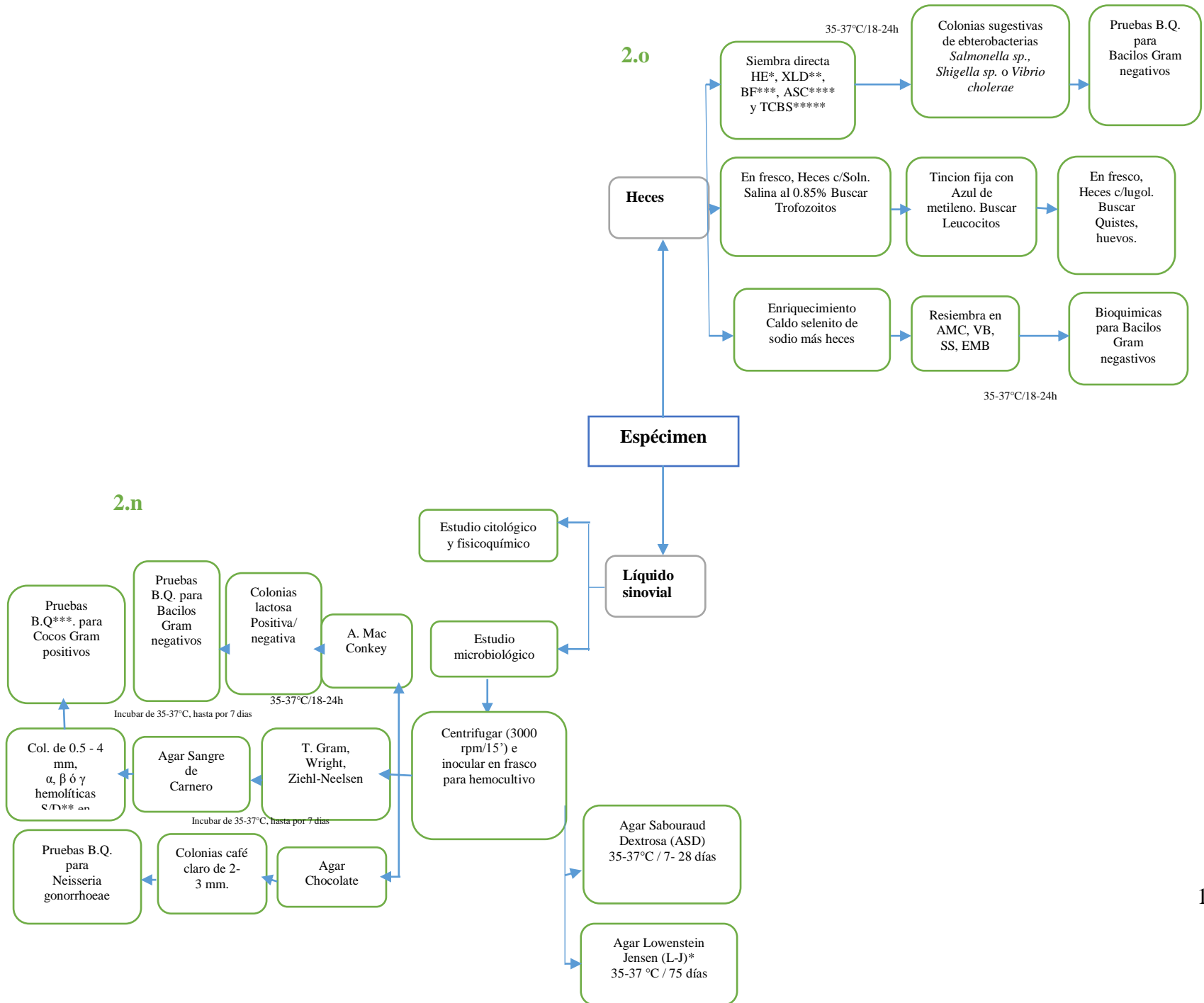


2.h



2.j







BIBLIOGRAFÍA

1. Baron, E., Cassel, G., Duffy, L., 1993. **American Society for Microbiology**. Laboratory Diagnosis of Female Genital Tract Infections, CUMITECH. 17A:1-23.
2. Calderón J. 1997. **Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos**. México.
3. Chusid, M., J., R.W. Perzigian, W. M. 1999. **Guía para el manejo de especímenes clínicos en microbiología**. 2ª. Edición. Ed. ASM PRESS Washington, D.C.
4. Díaz R., Gamazo C y López-Goñi I. 1995. **Manual Práctico de Microbiología**. España: Ed. Masson, S. A.
5. Dunne, W., Nolte F., Wilson M. 1997. **American Society for Mycrobiology**. Blood cultures III. CUMITECH. 1B: 1-21.
6. Jawetz., Melnick y Adelberg. 1998. **Microbiología Médica**. México: Ed. El Manual Moderno.
7. Koneman E., Allen S., Dowell V.R., Janda W., Sommers H y Winn W. 2008. 6ª. Ed. **Diagnóstico microbiológico**. México: Editorial Médica panamericana.
8. MacFadin J. 1984. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. México: Ed. Médica Panamericana. S.A.
9. Mandell G., Bennett J., Dolin R. 1997. **Enfermedades Infecciosas. Principios y práctica**. Ed. Médica Panamericana. 1214-1228.
10. Murray P., Drew W., Kobayashi G y Thompson J. 2009. **Microbiología Médica**. España: 6ª. Ed. Mosby Year Book.
11. Ponce de León S., Macías E., Molina J y Avila C. 2000. **Guía Práctica Infecciones Intra-Hospitalarias**. Ed. Especial CEFROM: 127-130, 101-114, 115-127.
12. Voet D., Voet J.G. y Pratt C. W. 2007. **Fundamentos de bioquímica, la vida a nivel molecular**. Sección 3-5 paginas 62-65.
13. NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
14. NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis

<http://www.cdc.gov/od/ohs>

<http://www.seimc.org/protocolos/>