



versión digital
ISSN: 1578-7516



COMPLEJO ASISTENCIAL DE ZAMORA
Hospital Virgen de la Concha
Hospital Provincial
Hospital Comarcal de Benavente

Unidad de Calidad
www.calidadzamora.com



NuevoHospital

Vol. IV - Nº 34 - Año 2004 - Nº edición: 92

Publicado el 20 de diciembre de 2004

Sumario

Protocolos normalizados de Microbiología

COMPLEJO ASISTENCIAL DE ZAMORA. Hospital Virgen de la Concha Servicio de Microbiología

Brezmes Valdivieso, M.F; Gutiérrez Zufiaurre, N; López-Urrutia Lorente, L.

1- Hemocultivos	2
2- Estudio bacteriológico de la orina: urocultivo	45
3- Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	59
4- Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	88

NuevoHospital
Unidad de Calidad
Hospital Virgen de la Concha
Avda. Requejo 35
49022 Zamora
Tfno. 980 548 200
www.calidadzamora.com

Periodicidad: irregular
Editor: Hospital Virgen de la Concha. Unidad de Calidad
Coordinación Editorial: Rafael López Iglesias (Director Gerente)
Dirección: Jose Luis Pardal Refoyo (Coordinador de Calidad)
Comité de Redacción:
Isabel Carrascal Gutiérrez (Supervisora de Calidad)
Teresa Garrote Sastre (Unidad de Documentación)
Carlos Ochoa Sangrador (Unidad de Investigación)
Margarita Rodríguez Pajares (Grupo de Gestión)
ISSN: 1578-7516

©Hospital Virgen de la Concha. Unidad de Calidad. Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida sin la autorización por escrito de los propietarios.

HEMOCULTIVOS
PROTOCOLO NORMALIZADO DE TRABAJO

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA
HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA
ZAMORA

PROTOCOLO NORMALIZADO DE HEMOCULTIVOS

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha
LUIS LÓPEZ- URRUTIA LORENTE	Diciembre-2004	Mª FE BREZMES VALDIVIESO NIEVES GUTIÉRREZ ZUFIAURRE	Diciembre-2004

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE MODIFICACIONES
01	Diciembre-2004	Edición inicial

COPIA REGISTRADA Nº.....ASIGNADA A LA SECCIÓN.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de la Concha de Zamora.

La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Propósito y alcance	1
1.2. Fundamento	1
1.3. Indicaciones	2
2. Documentos de consulta	2
3. Obtención de la muestra	3
3.1. Extracción de la sangre	3
3.2. Envío	4
4. Medios de cultivo, reactivos y productos	4
4.1. Frascos de hemocultivos	4
4.2. Medios de cultivo para subcultivos y sensibilidad	5
4.3. Reactivos y productos	6
5. Aparatos y material	7
6. Procesamiento	8
6.1. Recepción y registro	8
6.2. Introducción de los hemocultivos en el sistema	10
6.3. Hemocultivos positivos	10
6.3.1. Extracción de los frascos positivos	10
6.3.2. Procesamiento de los frascos positivos	10
6.3.2.1. Tinción de Gram	10
6.3.2.2. Subcultivos	11
6.3.2.3. Lectura de placas e identificación de los microorganismos	12
6.4. Hemocultivos negativos	13
7. Microorganismos y situaciones especiales	13
7.1. Brucelosis	14
7.2. Tularemia	14
7.3. <i>Abiotrophia</i>	14
7.4. Micobacterias	15
7.5. Hongos	15
7.6. Endocarditis	15
7.7. Bacteriemia asociada a catéter	16
8. Obtención y expresión de resultados	17
8.1. Informe preliminar	17
8.2. Informe de resultados definitivos	18
8.2.1. Informe de resultados positivos	18
8.2.2. Informe de resultados negativos	19
9. Responsabilidades	19
10. Anotaciones al procedimiento	19
11. Limitaciones al procedimiento	19
12. Bibliografía	20
ANEXO I: Hemocultivos : extracción	21
ANEXO II: Bact/Alert 3D: procedimientos básicos	26
ANEXO III: Esquemas de identificación de microorganismos	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente texto es establecer un documento con las normas e instrucciones a seguir en el procesamiento de los hemocultivos en nuestro laboratorio para el diagnóstico de las bacteriemias y fungemias.

La aplicación del mismo se extiende desde la extracción de los mismos hasta la emisión de resultados.

1.2. FUNDAMENTO

La realización de cultivos de sangre persigue el diagnóstico de **bacteriemias** y **fungemias**, las cuales se definen como la presencia de bacterias u hongos en la sangre.

La bacteriemia y la fungemia son complicaciones graves de las infecciones bacterianas y fúngicas, con importantes implicaciones pronósticas pues se asocian a una elevada mortalidad.

Ambas se producen cuando los microorganismos se multiplican a un ritmo que supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos e invaden el torrente sanguíneo, desde un foco infeccioso extravascular (a través de los vasos linfáticos) o intravascular (endocarditis, infección de catéteres intravenosos o arteriales...). De esta forma se diseminan rápidamente a través del cuerpo, causando enfermedad grave. Además como consecuencia de determinantes de patogenicidad y productos de su metabolismo pueden conducir a sepsis, shock séptico y fallo multiorgánico que tiene una elevada mortalidad.

Así pues la detección rápida del agente responsable es trascendente para conocer su sensibilidad a los antimicrobianos e instaurar un tratamiento adecuado.

El diagnóstico de las bacteriemias y fungemias en la actualidad es dependiente de los hemocultivos; sin embargo debido a la sensibilidad de los métodos utilizados, el procedimiento debe estar cuidadosamente controlado en la fase preanalítica (recogida) para evitar errores en la interpretación errónea de microorganismos comensales de la piel como agentes de infección.

1.3. INDICACIONES

De forma general las indicaciones más importantes para la realización de hemocultivos son pacientes con la sospecha clínica o signos siguientes:

- sospecha clínica de sepsis, meningitis, osteomielitis, pielonefritis, infección intrabdominal, artritis, infecciones graves de la piel y tejidos blandos, neumonía, endocarditis y fiebre de origen desconocido (absceso oculto, fiebre tifoidea, brucelosis, tularemia, etc.).
- signos: - fiebre ≥ 38 °C o hipotermia (neonatos o ancianos)

- escalofríos
- estado de shock
- leucopenia o leucocitosis
- trombopenia o alteraciones de la coagulación de causa no filiada
- disminución súbita de la vitalidad en niños o ancianos

2. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de recogida, transporte y conservación de las muestras.
- Manual de procesamiento de las muestras.
- Manual de envío de muestras a laboratorios de referencia.
- Protocolos de identificación bacteriana.
- Manuales de instrucciones de las técnicas aplicadas.
- Normas NCCLS de las pruebas de sensibilidad a antibióticos.
- Manual de Seguridad del Laboratorio de Microbiología clínica. SEIMC.

3. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

3.1. EXTRACCION DE LA SANGRE

La descripción detallada de extracción de sangre para hemocultivo aparece recogida en el anexo I (extraído del manual de recogida de muestras a disposición en intranet www.calidadzamora.com.)

Debemos resaltar de todo lo indicado en el mismo:

- la extracción debe ser realizada con extrema precaución, tal como está descrito, para evitar contaminaciones con la flora microbiota de la piel y de este modo permitir una valoración adecuada del crecimiento observado como representativo de una bacteriemia verdadera.
- Cada extracción debe realizarse siempre de venopunciones diferentes, y nunca a través de catéter, salvo en los casos de sepsis asociados a éste.
- El volumen de sangre es un factor crítico, pues la concentración de microorganismos es baja.
- La dilución de la sangre en el medio de cultivo es necesaria para neutralizar sus propiedades bactericidas. En el sistema automático BacT/ALERT 3D disponible en nuestro laboratorio la dilución

es de 1/4 para un volumen de 10 ml/frasco en el caso de adultos y de 1/5 para un volumen de 4 ml en el caso de niños. No deben llenarse más las botellas pues puede causar lecturas de falsos positivos.

- Como norma general debe extraerse la sangre lo más cerca posible de los síntomas (pico febril, escalofríos...) y antes del tratamiento antibiótico.
- El número óptimo de extracciones es 2-3, con intervalos de tiempo no estrictamente establecidos (reflejamos en el manual algunas recomendaciones).
- Cada frasco inoculado debe ser debidamente identificado con los datos del paciente y con el número de extracción (1ª, 2ª o 3ª), teniendo la precaución de no tapar la etiqueta de código de barras del frasco.

3.2. ENVÍO

Cada hemocultivo o extracción debe ir acompañado de un volante en el que consten los siguientes datos:

- Datos del paciente: número de historia clínica, nombre y apellidos.
- Servicio, planta y número de cama en el que está ingresado.
- Fecha de extracción y orden que ocupa dicha extracción.
- Nombre del médico que realiza la petición.
- Diagnóstico.
- Tratamiento antimicrobiano.
- Tipo de análisis que se solicita: hemocultivo convencional (bacteriología), hongos, o si se sospecha de otro tipo de microorganismos de crecimiento lento o con requerimientos excepcionales.

Los frascos identificados y los volantes correspondientes deben ser transportados al laboratorio inmediatamente. Se podrán mantener a temperatura ambiente un tiempo no superior a 2 horas. Si no es posible enviarlos antes, deben incubarse en la estufa de 37 °C situada a la entrada del laboratorio de microbiología.

NUNCA DEBEN SER DEJADOS EN NEVERA.

4. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

4.1. FRASCOS DE HEMOCULTIVOS

Deben estar en cada control de enfermería suministrados por el almacén general, conservándose a temperatura ambiente hasta su utilización. Los frascos

utilizados en nuestro hospital aparecen recogidos en la tabla I. Antes de su utilización debe comprobarse que el medio está claro y que el sensor está intacto y de color azul-verdoso (no utilizar si está amarillo).

Medio de cultivo	Distribuidor/referencia	ódigo Hospital	Conservación	Indicación
BacT/Alert MB® + MbBact Fluido de enriquecimiento	BioMérieux/251011 BioMérieux/259877	17490 17491	T ^a ambiente 4°C	Hemocultivo micobacterias
BacT/Alert® Standard Aerobic	BioMérieux/615007	12903	T ^a ambiente	Hemocultivo aerobio general
BacT/Alert® Standard Anaerobic	BioMérieux/615008	12904	T ^a ambiente	Hemocultivo anaerobio general
BacT/Alert® FAN Aerobic	BioMérieux/615003	17770	T ^a ambiente	Hemocultivo aerobio U.V.I.
BacT/Alert® FAN Anaerobic	BioMérieux/615004	17771	T ^a ambiente	Hemocultivo anaerobio U.V.I.
BacT/Alert® Pediatric FAN	BioMérieux/615005	17769	T ^a ambiente	Hemocultivo pediátrico

Tabla 1: Frascos de hemocultivos

4.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA SUBCULTIVOS Y PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

En la tabla 2 aparecen recogidos los diferentes medios de cultivos disponibles en nuestro laboratorio para la realización de subcultivos, identificación y pruebas de sensibilidad.

Medio de cultivo	Distribuidor/referencia	ódigo Hospital	Conservación	Indicación
Chocolate+polivitalax	BioMérieux/43101	12696	4 °C	Crecimiento no selectivo
Tripticasa-soja+ 5% sangre	BioMérieux/43001	12694	4 °C	Crecimiento no selectivo

Columbia CNA+ 5% sangre	BioMérieux/43071	12698	4 °C	Selectivo gram positivos
MacConkey	BioMérieux/43141	12689	4 °C	Selectivo gram negativos
Schaedler vita K1+5% sangre de carnero	BBL/4354042	12668	4 °C	No selectivo bacterias anaerobias
Schaedler kanamicina-vancomicina	BBL/4354023	12669	4 °C	Selectivo bacterias anaerobias gram negativas
Sabouraud Glucosa-cloranfenicol	Soria Melguizo/51078	17040	4 °C	Hongos levaduriformes y filamentosos
Mueller-Hinton 2	BioMerieux/43301	17473	4 °C	Pruebas de sensibilidad
Mueller-Hinton 5 % sangre	BioMerieux/43321	12878	4 °C	Pruebas de sensibilidad
Mueller-Hinton-chocolate	BBL/43544035	12670	4 °C	Pruebas de sensibilidad
Agar MRSA	Becton Dickinsos/254570	14947	4 °C	Detección de resistencia meticilina
Agar CLED	Oxoid/PP00301	12802	4 °C	Control pureza de paneles COMBO gram negativos
Chocolate+polivitalex+VCAT	BioMerieux/43241	12699	4 °C	<i>N. meningitidis/gonorrhoeae</i>

Tabla 2: Medios de cultivo y subcultivo

4.3. REACTIVOS Y PRODUCTOS

Aparecen recogidos en la tabla 3 los diferentes reactivos y productos utilizados para la identificación y pruebas de sensibilidad de los microorganismos aislados.

Nombre comercial	Distribuidor/referencia	Código hospital	Conservación	Indicaciones
Betadine	Servicio de Farmacia		T ^a ambiente	Desinfección frascos
Reactivos de Tinción Gram	Soria-Melguizo Violeta: 999802 Yodo: 997235 Safranina: 996501	13965 13996 14351	T ^a ambiente	Tinción de Gram
Acetona	VORQUIMICA	10003	T ^a ambiente	Alcohol-acetona (GRAM)

Alcohol etílico absoluto	PANREAC	12791	4	T ^a ambiente	Alcohol-acetona (GRAM)
Catalasa 30 %	FORET	armacia	F	T ^a ambiente	Identificación estafilococos/estercococos/anaerobios/
Slidex Staph Plus ("coagulasa en porta")	BioMérieux/73115	12872	4	4°C	Identificación estafilococos
Coagulasa plasma EDTA	BBL/0803-46-5	13999	4	4°C	Identificación estafilococos
Oxidasa Test	Mast-Diagnostic/371021	14534	4	4°C	Identificación <i>Neisseria/Haemophilus</i> /Bacilos gram negativos (BGN)
Optoquina	BD BBL / 231046	12909	4	4°C	Identificación <i>S. pneumoniae</i>
Solubilidad en bilis (desoxicolato sódico)	Sigma/ D6750	14967	4	4°C	Identificación <i>S. pneumoniae</i>
Slidex pneumo kit	BioMérieux/5882-1	12864	4	4°C	Identificación <i>S. pneumoniae</i>
Slidex Strepkit	BioMerieux/58810	12869	4	4°C	Identificación de estreptococos β-hemolíticos
PYR Test (pirrolidonil arilamidasa)	Mast-Diagnostic/371021	17321	4	4°C	Identificación estreptococos
Antisuero <i>Francisella tularensis</i>	Becton Dickinson/240939	17291	4	4°C	Identificación <i>Francisella tularensis</i>
Antisuero <i>Brucella melitensis</i>	REMEL/30164901	-	-	4°C	Identificación <i>Brucella</i>
Antisuero <i>Neisseria meningitidis</i> polivalente (A,B,C,D)	DIFCO/ 222321 (R2232-50)	14897	4	4°C	Identificación <i>Neisseria meningitidis</i>
Antisuero <i>Neisseria meningitidis</i> grupo A	DIFCO/ 222281 (R2228-50)	14898	4	4°C	Identificación <i>Neisseria meningitidis</i> grupo A
Antisuero <i>Neisseria meningitidis</i> grupo B	DIFCO/222291 (R2229-50)	14899	4	4°C	Identificación <i>Neisseria meningitidis</i> grupo B
Antisuero <i>Neisseria meningitidis</i> grupo C	DIFCO/ 222301 (R2230-50)	14901	4	4°C	Identificación <i>Neisseria meningitidis</i> grupo C
Antisuero <i>Neisseria meningitidis</i> grupo D	DIFCO/ 222311 (R2231-50)	14900	4	4°C	Identificación <i>Neisseria meningitidis</i> grupo D
Antisueros <i>Salmonella</i>	Ver PNT coprocultivos			4°C	Serotipado de <i>Salmonella</i> spp
Antisuero <i>H. influenzae</i> Poly a,b,c,d,e,f	DIFCO/222371	14732	4	4°C	Identificación de <i>H. influenzae</i>
Antisuero <i>H. influenzae</i> tipo b	DIFCO/222361	14731	4	4°C	Identificación <i>H. influenzae</i> tipo b
API Strep	BioMérieux/2060	12859	4	4°C	Identificación de <i>Streptococcus</i> spp

Api Coryne	BioMérieux/20900	12683	4	4°C	Identificación corineformes
Api 20 A	BioMérieux/2030	12936	4	4°C	Identificación anaerobios
ATB ANA	BioMerieux/14269	13963	4	4°C	Sensibilidad anaerobios
ID 32GN	BioMerieux/32100	14306	4	4°C	Identificación BGN
ID 32 STAPH	BioMerieux/32500	14308	4	4°C	Identificación estafilococos
ID32 levaduras	BioMérieux/32200	14307	4	4°C	Identificación levaduras
Discos factores X y V	MastDiagnostics/D45C	12738	4	4°C	Identificación de <i>Haemophilus spp</i>
Discos factores X	MastDiagnostics/D43C	14887	4	4°C	Identificación de <i>Haemophilus spp</i>
Discos factores V	MastDiagnostics/D44C	12908	4	4°C	Identificación de <i>Haemophilus spp</i>
Panel <i>Haemophilus-Neisseria</i> (HNID)	Dade Behring/B1012-10B	12850	4	4°C	Identificación de <i>Haemophilus spp/Neisseria spp/ Moraxella catarrhalis</i>
Sensititre <i>Haemophilus/Neisseria/Strept</i>	DADE Behring/772emizaa4	13988	4	4°C	Sensibilidad <i>Haemophilus spp, Neisseria, Streptococcus</i>
COMBO gram negativos	Dade Behring/B-1016-80	13883	4	T ^a ambiente	Identificación y sensibilidad gram negativos
COMBO gram positivos	Dade Behring/B-1016-71	13882	4	T ^a ambiente	Identificación y sensibilidad gram positivos
Discos de antibióticos	BioMérieux/Oxoid /Biodiscs			4 °C	Sensibilidad (disco-placa)
Disco cefinasa	BBL/31650	13955	4	4 °C	Detección betalactamasa
Tiras de E-TEST	AB Biodisk/Izasa			-20 °C	CMI
Screening MRSA	Denka Seken CO/K1096	12743	4	4 °C	Detección de la proteína PBP2a
ANAEROGEN	Oxoid/AN0025A	14857	4	T ^a ambiente	Generador anaerobiosis jarra
GENbag anaer	BioMérieux/45534	12686	4	T ^a ambiente	Generador anaerobiosis bolsa

Tabla 3: Reactivos y productos

5. APARATOS Y MATERIAL

- Sistemas automáticos de monitorización continua BacT/Alert 3D y MB/BacT (BioMérieux®): no invasores, de agitación y monitorización continua de cada

frasco. Utilizan un sensor colorimétrico y luz reflejada para detectar la presencia y producción de dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo. El CO₂ producido por el crecimiento microbiano determina que el sensor colorimétrico permeable al gas situado en el fondo de los frascos cambie de color azul verdoso a amarillo. Este cambio de color se refleja en un aumento de las unidades de reflectancia controladas por el sistema. El sistema registra las lecturas cada 10 minutos.

- **Cabina de seguridad biológica (TELSTAR BIO-II-B).**
- **Estufa de aerobiosis /37 °C para conservación de hemocultivos hasta procesamiento y subcultivos microorganismos aerobios.**
- **Estufa de aerobiosis /30 °C para subcultivo de hongos.**
- **Estufa de CO₂ (5-10 %) / 37°C para subcultivos de microorganismos microaerófilos / capnófilos.**
- **Microscopio óptico.**
- **Jarras o bolsas de incubación de anaerobiosis.**
- **Sistema automático para identificación y sensibilidad: Lector MicroScan autoScan4 (Dade Behring®) y semiautomáticos (API: BioMerieux®).**
- **Material fungible: asas de inoculación, portaobjetos, cubreobjetos, pipetas Pasteur, agujas de ventilación hemocultivos...**
- **Micropipetas 1, 10 y 100 µl.**
- **Sistema informático (gestión administrativa , emisión de resultados).**

6. PROCESAMIENTO

En la figura 1 aparece recogido el organigrama de procesamiento y emisión de informes de los hemocultivos.

6.1. RECEPCIÓN Y REGISTRO

1.- Inspección inicial: En cuanto se reciban los hemocultivos en el laboratorio deben ser examinados cuidadosamente, comprobando que estén íntegros, sin roturas ni fisuras, y que el volumen de sangre es adecuado.

Comprobar que cada pareja de frascos tiene un volante y que coinciden los datos que figuran en ambos.

2. Criterios de rechazo: En general debido a la importancia del diagnóstico de la bacteriemia, no se rechazará nunca, salvo que los frascos estén dañados o haya serias dudas en cuanto a la identificación de la muestra, poniéndose siempre en contacto con el servicio que los remite para intentar solucionarlas. Si se aceptan, deberá reflejarse siempre la deficiencia encontrada, para interpretar los resultados con precaución.

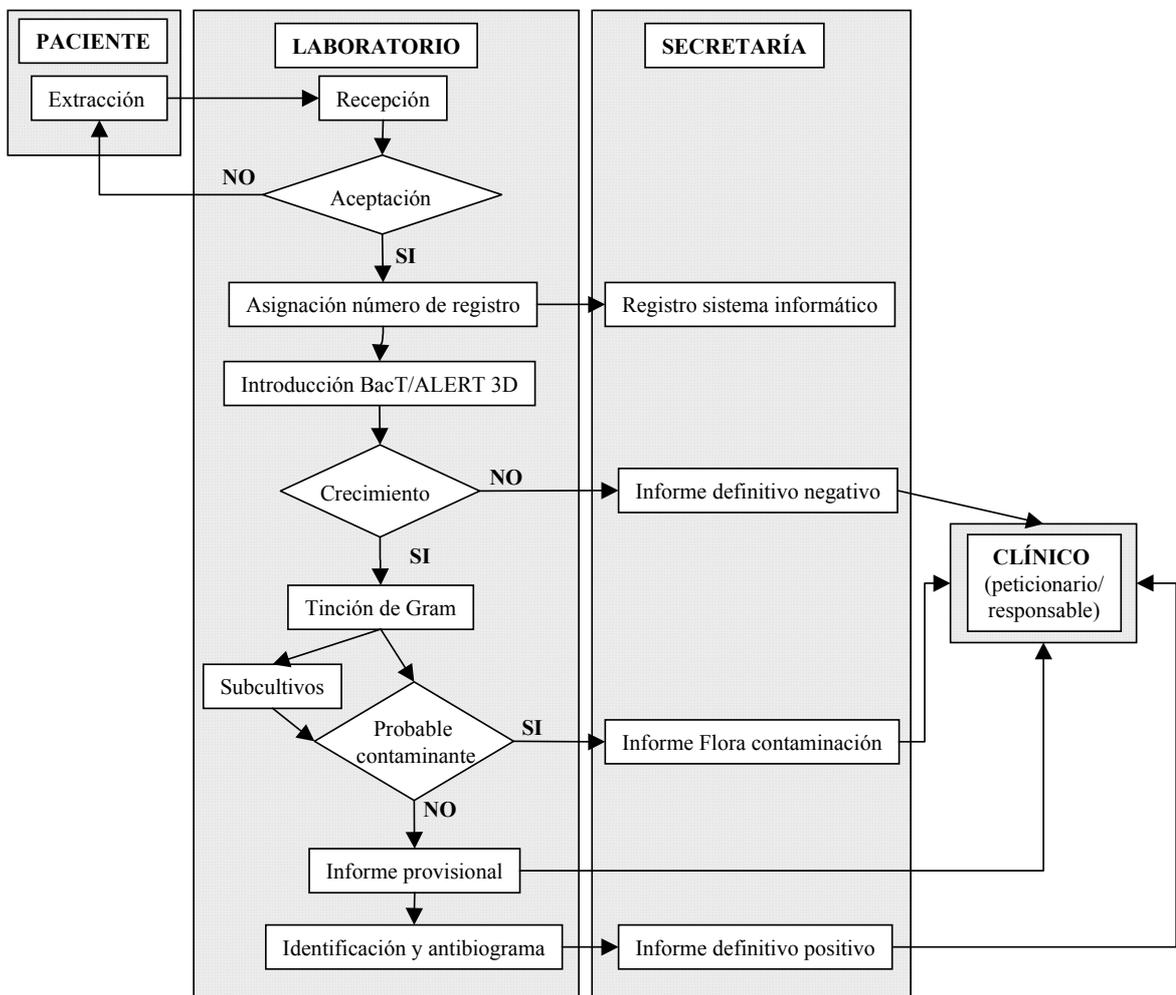


Figura 1: Organigrama del procesamiento y emisión de informes de hemocultivos

3. Asignar a cada extracción un número correlativo de registro del laboratorio, anotándolo en el volante y los frascos correspondientes. Los frascos disponen de una lengüeta adhesiva correspondiente a su código de barras, que debe adherirse al volante correspondiente.

4. Los volantes deberán pasarán a Secretaría para su registro en el sistema de gestión del laboratorio, y los frascos a la sección de hemocultivos para comenzar su procesamiento.

6.2. INTRODUCCIÓN DE LOS HEMOCULTIVOS EN EL SISTEMA (ver anexo II)

6.3.- HEMOCULTIVOS POSITIVOS

6.3.1. EXTRACCIÓN DE LOS FRASCOS POSITIVOS

Los hemocultivos detectados como positivos por el sistema automatizado serán extraídos según se indica en el anexo II.

6.3.2. PROCESAMIENTO DE LOS FRASCOS POSITIVOS

Desinfectar el tapón de goma del frasco con Betadine® (dejar secar). Tras invertir los frascos con una ligera agitación, se extrae con una jeringa un pequeño volumen de caldo. Se puede realizar esta extracción utilizando la aguja de ventilación que permite, invirtiendo el frasco, la salida de caldo. Algunos autores recomiendan la extracción de 2-5 ml y depositarlo en un tubo estéril rotulado con el número del frasco.

En nuestro laboratorio de esta primera extracción (realizada con las agujas de ventilación) se realiza:

6.3.2.1. Tinción de Gram

- Sobre un porta rotulado con el número del frasco y el tipo de frasco (AE: aerobio, ANA : anaerobio) se depositan 1 ó 2 gotas.
- Se extiende la gota ligeramente con el asa.
- Se deja secar en la cabina de seguridad.
- Fijación con calor.
- Se realiza la tinción de Gram.
- Se observa al microscopio óptico a 1000 aumentos con aceite de inmersión.

- Se anota el resultado de la tinción en el volante de petición.

6.3.2.2. Subcultivos

Previa e independientemente a la visualización del Gram se realiza a todo hemocultivo detectado como positivo un subcultivo a una placa de agar chocolate-polivitalax y a los frascos anaerobios además se siembra una placa de agar Schaedler. Se incuban a 37 °C en estufa de CO₂ (agar chocolate, 24-48 h) y en anaerobiosis (agar Schaedler, bolsa o jarra, 48-72 h).

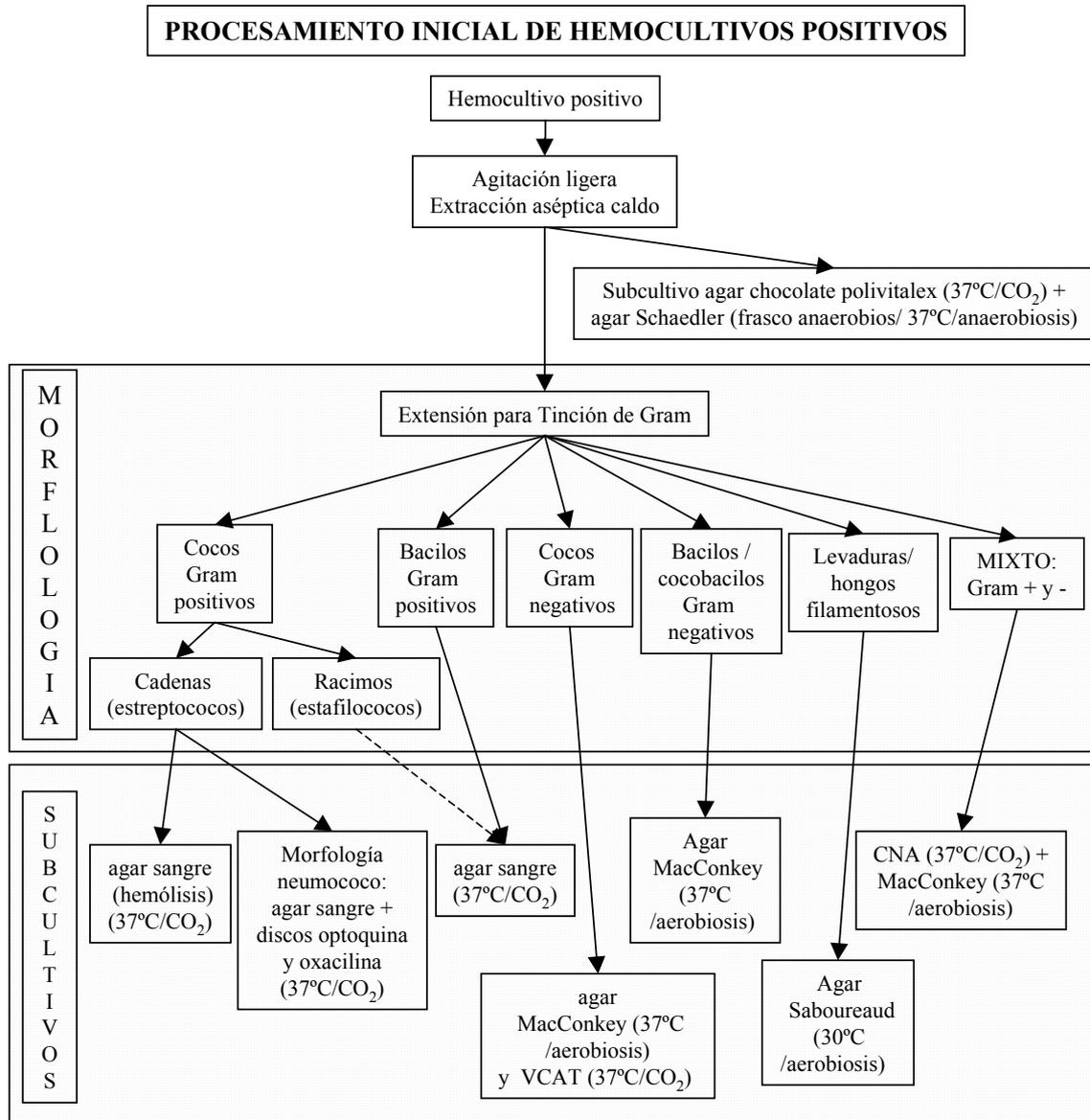


Figura 2: Procesamiento inicial de los hemocultivos positivos

En función de la visualización del Gram se harán subcultivos a medios específicos (ver figura 2) que se incubarán a las temperaturas y atmósferas indicadas en la misma.

6.3.2.3. Lectura de placas e identificación de los microorganismos.

Las placas de subcultivo incubadas se leerán a las 18-24 horas, si bien deben reincubarse todas 48 horas. Los microorganismos que hayan crecido y que se

consideren productores de bacteriemia significativa, se identificarán de forma definitiva y se realizarán las pruebas de sensibilidad correspondientes. En los esquemas del anexo III aparece recogida la rutina a seguir en nuestro laboratorio para la identificación de los microorganismos aislados en función de la morfología, tinción de Gram y crecimiento en aerobiosis o anaerobiosis; dichos esquemas pretenden reflejar el esquema de trabajo a seguir en la identificación de los microorganismos y no tanto una exposición exhaustiva de las diferentes pruebas bioquímicas de identificación que permiten la diferenciación de cada especie. Los microorganismos considerados como contaminantes se identificarán sólo a nivel de género. Se anotarán en las “hojas de trabajo” las pruebas que deben realizarse a cada placa.

Se denomina bacteriemia verdadera a aquella producida por microorganismos realmente presentes en la sangre de los pacientes y falsa bacteriemia a la causada por una contaminación accidental de los medios de cultivo, por la microbiota cutánea del enfermo o del personal que realiza la toma del hemocultivo, en el momento de la extracción o durante su procesamiento en el laboratorio. Esta distinción es de máxima importancia y trascendencia para el paciente, pero en la mayoría de las ocasiones el laboratorio no dispone de elementos suficientes para establecer con seguridad la significación de la bacteriemia.

Uno de los datos orientativos lo constituye la propia identidad de los microorganismos aislados. Así *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* son responsables en un alto porcentaje de casos de bacteriemias verdaderas. Por el contrario, es dudoso el papel de microorganismos que forman parte de la flora bacteriana del paciente como los estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus* del grupo viridans, *Corynebacterium* spp, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp. y algunas especies de *Clostridium*. Sin embargo algunos de estos microorganismos pueden ser responsables de auténticas bacteriemias por lo que debe valorarse también el número de hemocultivos en que se repite el aislado. Así la repetición de la misma bacteria en más de una extracción (suponiendo una buena práctica de la misma) aumenta la probabilidad de bacteriemia verdadera,

mientras que su presencia en un solo hemocultivo sugiere una contaminación. Por lo tanto los microorganismos antes descritos como dudosos patógenos deben estar presentes con idéntico biotipo y antibiotipo en 2 o más hemocultivos o extracciones del mismo paciente para poder ser considerados como productores de verdadera bacteriemia.

Puede así mismo servir de ayuda para la interpretación la existencia de cuerpos extraños o focos infecciosos de los que se haya aislado el mismo microorganismo que en la sangre, por lo que debe examinarse el resto de cultivos del mismo paciente recibidos en el laboratorio.

Por todo lo expuesto anteriormente el microbiólogo debe compartir la información que posee con el clínico responsable del paciente, para que con los datos clínicos de éste, se valoren los resultados obtenidos.

6.4. HEMOCULTIVOS NEGATIVOS

De forma genérica los hemocultivos se incuban 7 días. Transcurrido dicho plazo los frascos en los que no se ha detectado crecimiento serán extraídos (anexo II) y desechados.

7. MICROORGANISMOS Y SITUACIONES ESPECIALES

Es fundamental que el clínico informe en el volante de petición o bien personalmente, cuando se encuentre ante la sospecha de infección por un agente etiológico infrecuente y que además sea de difícil aislamiento y crecimiento, para poder adaptar el procesamiento de los hemocultivos.

7.1. BRUCELOSIS

En los sistemas automáticos se aísla *Brucella* spp. en los frascos aerobios más rápidamente que en los clásicos medios de Castañeda o bifásicos. Se debe prolongar el periodo de incubación hasta 21 días y al finalizar dicho periodo se realiza un subcultivo en agar chocolate, incubando la placa 3 o 4 días antes de descartar el hemocultivo como negativo.

Exige un nivel 2 de seguridad para procesar muestras sospechosas de contener *Brucella* y un nivel de seguridad 3 para manipular los cultivos de dicho microorganismo. (Ver Procedimientos de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica, SEIMC).

7.2. TULAREMIA.

Francisella tularensis sólo está en la sangre en la fase aguda de la enfermedad, por lo que su aislamiento en hemocultivos es extremadamente raro. Si existe la sospecha deben incubarse los frascos 14 días, subcultivándolos al final del periodo de incubación, en agar chocolate. Niveles de seguridad 2 y 3. Habitualmente el diagnóstico se realiza a través de estudios serológicos.

7.3. *Abiotrophia*.

Antes se consideraban estreptococos con requerimientos nutricionales especiales y se incluían en los estreptococos del grupo *viridans*. Crecen bien en los frascos de hemocultivos pues contienen sangre fresca del paciente. Son cocos gram positivos, con tendencia a agruparse en cadenas, aunque a menudo su morfología es deforme mostrando un aspecto cocobacilar incluso gram variable. No crecen en agar sangre ni chocolate, lo que dificulta su aislamiento, siendo necesario realizar el subcultivo en placas de agar sangre enriquecida con vitamina B6 o con cisteína. Las placas empleadas para anaerobios, que suelen contener cisteína, permiten también su desarrollo. Una forma sencilla de demostrar su deficiencia nutricional es realizando una estría de *S. aureus* hemolítico en una placa de agar sangre; a las 24-48 horas se puede observar crecimiento de microcolonias haciendo satelitismo alrededor de la estría de estafilococo.

7.4. MICOBACTERIAS

Existen frascos específicos para estudio de micobacterias en sangre. En el anexo I aparece reflejado el modo de extracción de la sangre para dicho estudio. En nuestro laboratorio se procesan en la sección de micobacterias. Una vez recibida la sangre se inocularán 3-5 ml del tubo de recolección en los frascos específicos (previamente preparados añadiendo 1 ml del fluido de enriquecimiento). Las botellas serán incubadas durante 42 días en el sistema automático de

monitorización continua, MB/BacT (sin agitación) de la sección de micobacterias que utiliza el mismo principio de detección de microorganismos que el BacT/Alert 3D, esto es un sensor colorimético y luz reflejada para detectar la presencia y producción de dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo.

7.5. HONGOS

Los pacientes con un mayor riesgo de fungemia son los inmunodeprimidos, especialmente hematológicos y transplantados.

Los hongos levaduriformes son responsables de la mayoría de las fungemias, siendo el género *Candida* el más frecuente. Las levaduras se aíslan en los frascos aerobios de hemocultivo con relativa rapidez, no después de 5-7 días de incubación. Como aparece recogido en la figura 1 cuando se observen en el Gram se debe hacer una siembra en Saboureaud-cloranfenicol e incubar a 22-30 °C.

Si se sospecha que el agente causal es un hongo dimórfico o filamentoso, es recomendable prolongar su incubación; en nuestro laboratorio realizamos un subcultivo a Saboureaud-Cloranfenicol de los frascos aerobios al finalizar los 7 días de incubación, el cual incubamos a 30°C durante 15 días, antes de considerarlo como negativo.

Las levaduras aisladas se enviarán al Centro Nacional de Microbiología para estudio de sensibilidad a antifúngicos.

7.6. ENDOCARDITIS.

En caso de sospecha de una endocarditis de etiología infecciosa deben realizarse hemocultivos con objeto de detectar la bacteriemia continua. En el anexo I relativo a la extracción de hemocultivos aparecen recogidos el número e intervalo de extracción de hemocultivos para las situaciones de endocarditis aguda, subaguda o en tratamiento.

Los microorganismos más habituales causantes de endocarditis (estafilococos, estreptococos y enterococos) suelen crecer en las primeras 48 horas. Sin embargo existen microorganismos causantes de endocarditis como los del grupo HACEK (cocobacilos gram negativos: *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* y *Kingella*), o la misma *Brucella* previamente citada, que son de

crecimiento lento, por lo que ante una sospecha de endocarditis los hemocultivos deben incubarse 3 semanas, subcultivando en agar chocolate al final del periodo de incubación. En ocasiones, en pacientes con endocarditis infecciosa no se obtienen hemocultivos positivos por diversas causas como son técnicas microbiológicas inadecuadas, infección por microorganismos con necesidades nutricionales especiales, o agentes que usualmente no se aíslan en los hemocultivos (p.ej. *Bartonella* spp, *Legionella* spp, etc) y fundamentalmente por la administración de antimicrobianos de forma previa a la toma de muestras. En estos casos de endocarditis con hemocultivo negativo es recomendable realizar un estudio serológico frente a *Coxiella burnetii*, *Legionella*, *Brucella*, *Bartonella* y *Chlamydia*. Así mismo si el paciente mantiene un buen estado hemodinámico, lo indicado es suspender el tratamiento antibiótico y repetir los hemocultivos como mínimo 48 horas tras la suspensión.

7.7. BACTERIEMIA ASOCIADA A CATÉTER

La bacteriemia asociada a catéter requiere la confirmación microbiológica para tener un diagnóstico de certeza, esto es crecimiento del mismo microorganismo (idéntica especie y antibiograma) en cultivo semicuantitativo o cuantitativo del catéter retirado y en hemocultivo (preferiblemente obtenido de venopunción directa) en un paciente con síntomas de bacteriemia y en ausencia de otro foco de infección. En ausencia de confirmación microbiológica, la desaparición de la sintomatología tras la retirada del catéter en un paciente con bacteriemia puede ser considerada evidencia indirecta.

Se han descrito algunos procedimientos diagnósticos manteniendo el catéter. Entre ellos se encuentra la utilización de hemocultivos cuantitativos pareados (nº de u.f.c./ml en los hemocultivos por catéter supera en 4-10 veces el nº de u.f.c./ml en los hemocultivos obtenidos por venopunción directa). Este procedimiento es complejo y no está ofertado en nuestro laboratorio. Como aproximación se pueden comparar los hemocultivos extraídos por vena periférica y a través del catéter, apoyando el diagnóstico la obtención del mismo microorganismo (biotipo y antibiotipo) en ambos. Se ha propuesto que un adelanto en el crecimiento de los

hemocultivos obtenidos a través del catéter de 2 o más horas respecto a los obtenidos por vía periférica sugiere una infección de catéter dado el mayor inóculo bacteriano. Otras técnicas dirigidas al diagnóstico sin la retirada del catéter, como son los cultivos superficiales (piel, conexión o trayecto subcutáneo) o las tinciones rápidas en las muestras de la conexión o el cepillado intraluminal, pueden ser útiles en algunas ocasiones, dado el valor predictivo negativo de los primeros o la celeridad en el diagnóstico de los últimos.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

8.1. INFORME PRELIMINAR

Aquellos hemocultivos que se vayan detectando como positivos a lo largo de la mañana serán informados de forma telefónica especificando el resultado de la tinción de Gram, el número de hemocultivos en los que se observa crecimiento en relación con el total de los extraídos y la fecha de obtención de los mismos. Preferentemente se informará al clínico responsable del enfermo, en su ausencia al médico que le sustituya y si esto no es posible se informará a la supervisora de enfermería o enfermera al cargo de dicho paciente para que sea transmitida dicha información al médico en cuanto sea localizado. Es recomendable la emisión de un informe preliminar escrito.

Se anotará en el volante de petición la fecha en la que se emite este informe preliminar, a quien se comunica y que tipo de información se ha emitido. Se debe así mismo anotar en el volante de petición si el paciente está recibiendo antibiótico y en ese caso cuál es, para posteriores recomendaciones o emisión de informes de forma telefónica si no se adecuara al microorganismo aislado.

Si bien la emisión de este informe preliminar debe estar particularizada para cada enfermo se pueden establecer de forma general los siguientes casos para la emisión de los mismos:

- pacientes con 2 o más extracciones con cocos gram positivos en racimos (tipo estafilococo)
- pacientes con 1 o más extracciones con:
 - diplococos gram positivos

- **cocos gram positivos en cadenas**
- **bacilos gram negativos**
- **diplococos gram negativos**
- **levaduras**
- **flora mixta**

8.2. INFORME DE RESULTADOS DEFINITIVOS

8.2.1. Informe de resultados positivos.

Una vez finalizado el proceso de identificación y sensibilidad antibiótica de aquellos hemocultivos positivos en los que se aíslen microorganismos significativos se registrarán los resultados en el programa de gestión del laboratorio. Una vez impresos serán revisados por el facultativo responsable y se firmarán para ser enviados. Los informes de las extracciones del mismo paciente y de la misma tanda de hemocultivo serán enviados grapados y si alguna extracción continua negativa se emitirá informe/s pendiente/s junto con el positivo. Si existiera alguna discrepancia con la información preliminar se informará verbalmente.

Si los microorganismos se consideran contaminantes se informarán como flora de contaminación cutánea. Si ha existido un informe preliminar se especificarán a nivel de género (p. ej. estafilococos coagulasa negativa) y por qué razón se considera una contaminación (p. ej. diferentes tipos en una misma extracción).

8.2.2. Informe de resultados negativos

Los hemocultivos en los que no se aíslan microorganismos, transcurrido el periodo de incubación establecido, se informarán por escrito como:

- **al séptimo día negativo**
- **3º semana cultivo negativo**

9. RESPONSABILIDADES

Los técnicos/ enfermeras del laboratorio serán los responsables del procesamiento de los hemocultivos: recepción, introducción en el aparato automatizado, mantenimiento del mismo, extracción de los hemocultivos

detectados como positivos y/o negativos, realización de la tinción de Gram y subcultivos, pruebas de identificación y sensibilidad, siempre bajo la supervisión del facultativo responsable.

El facultativo de hemocultivos será el responsable de la emisión de resultados preliminares tras la visualización del Gram, de la interpretación de los resultados y de la validación de todos los informes emitidos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Los sistemas automáticos de monitorización continua, como el disponible en nuestro laboratorio, permiten determinar el momento en el que se produce el crecimiento de la mayor parte de las bacterias y los hongos de relevancia clínica.

11. LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO

Estos sistemas automáticos no permiten detectar el crecimiento de algunas bacterias como *Leptospira* spp, *Bartonella* spp, *Mycoplasma* spp, parásitos ni virus.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Bouza E., Loza E., Planes A., Rodríguez Cobacho A. Procedimientos en Microbiología Clínica. 3.Hemocultivos. 1993. Coordinador: J. Romero Vivas, Editor: J. Picazo. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Loza E., Planes A., Rodríguez Creixems M. Procedimientos en Microbiología Clínica. 3a.Hemocultivos. 2003. Coordinador: E. Loza. Editores. Emilia Cercenado y Rafael Cantón. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Fernández Guerrero M., Alarcón A., Fortún J., Llinares P. Protocolos Clínicos SEIMC. V. endocarditis e infecciones cardiovasculares. Coordinador: Almirante B.

- **Manual of Clinical Microbiology. 7th Ed/Editor in chief : Murray P. American Society for Microbiology.1999.**
- **Essential Procedures for Clinical Microbiology. Editor in chief: Isenberg H.1998. American Society for Microbiology.**

HEMOCULTIVOS: Extracción

Material necesario

- **Guantes estériles.**
- **Alcohol etílico o isopropílico 70 %.**
- **Povidona yodada (Betadine®).**
- **Fascos de hemocultivos:**
 - * ADULTOS:
 - aerobio (azul): **BacT/Alert® Standard Aerobic (ref. 615007), código hospital: 412903.**
 - anaerobio (morado): **BacT/Alert® Standard Anaerobic (ref. 615008), código hospital: 412904.**
 - UVI: **frascos especiales que contienen carbón activado (adsorción de antibióticos):**
 - aerobio (verde) **BacT/Alert® FAN Aerobic (ref. 615003), código hospital: 417770.**
 - anaerobio (naranja): **BacT/Alert® FAN Anaerobic (ref. 615004), código hospital: 417771.**
 - * PEDIÁTRICO (amarillo): **BacT/Alert® Pediatric FAN (ref. 615005), código hospital 417769.**
- **Set de extracción :**
 - **Palomilla de extracción vacío seguridad, código hospital: 419707.**
 - **Adaptador para frascos de hemocultivo.**

A.- Procedimiento de extracción

- **Utilizar guantes estériles.**
- **Desinfectar los tapones de los frascos con povidona yodada (Betadine®) o etanol, permitiendo que se sequen. Asegurarse que el medio está claro y que el sensor (base de la botella) esta intacto y de color azul-verdoso. No utilizar si el sensor está amarillo.**
- **Después de la palpación para elegir el sitio de la venopunción, desinfectar vigorosamente la piel con alcohol etílico o isopropílico 70 % durante 30 segundos.**
- **Aplicar povidona yodada concéntricamente desde el centro del sitio elegido para la venopunción, cubriendo un área circular de 2-4 cm de diámetro, durante 1 minuto.**
- **Dejar secar un minuto (necesario para que ejerza su efecto antioxidante).**
- **En pacientes alérgicos a los compuestos yodados se debe realizar doble aplicación de alcohol.**
- **No volver a palpar la vena tras esta preparación.**
- **Conectar el adaptador al extremo del set de extracción, realizar la punción y a continuación insertar en la botella el adaptador, presionando para pasar a través del tapón de la botella y que la sangre fluya a su interior; tras obtener volumen adecuado (líneas en la botella), proceder de igual forma en la otra botella. Finalmente retirar de la botella y quitar la aguja de la vena.**
- **Se recuerda que el vacío que incorporan los frascos succiona rápidamente la sangre. Agitar suavemente los frascos después de inoculados.**
- **Limpiar el sitio de la extracción con alcohol para quitar los restos de yodo (puede causar irritación).**

B.- Volumen de muestra

- **Es un factor crítico pues la concentración de microorganismos en sangre es baja.**
- **Para adultos se recomienda 20 ml (10-30 ml) por venopunción dividido en los dos frascos: 10 ml en un frasco anaerobio (morado/ UVI: naranja) y 10 ml en**

frasco aerobio (azul/ UVI: verde), teniendo especial cuidado en no introducir aire en el frasco de anaerobios.

- Para niños se recomienda 1-5 ml por venopunción e inocular en un único frasco (amarillo).

C.- Número de hemocultivos y momento de extracción

- UN HEMOCULTIVO se considera la sangre de una venopunción inculada en DOS BOTELLAS (adultos) separadas (aerobia y anaerobia) o en UNA BOTELLA en el caso de los niños.
- CADA HEMOCULTIVO DEBE REALIZARSE SIEMPRE DE VENOPUNCIONES DIFERENTES. Preferiblemente lo más cerca posible de los síntomas (pico febril, escalofríos...) y antes del tratamiento antibiótico.
- En caso de sepsis aguda, meningitis, osteomielitis, artritis, neumonías agudas y pielonefritis y otras situaciones que requieran instauración inmediata de antibióticos, recoger 2 hemocultivos de venopunciones diferentes de forma consecutiva antes del tratamiento.
- En caso de endocarditis:
 - aguda: 3 hemocultivos de venopunciones separadas durante la 1ª-2ª hora de evaluación, y comenzar terapia.
 - subaguda: 3 hemocultivos el primer día (separados 15 minutos o más); si son negativos a las 24 h, obtener tres más.
 - pacientes en tratamiento: 2 hemocultivos separados, en tres días sucesivos.
- En caso de fiebre de origen desconocido (absceso oculto, fiebre tifoidea, brucelosis, etc): 2 hemocultivos separados al menos 1 hora. Si son negativos 24 o 36 h más tarde, obtener 2 hemocultivos más separados 1 hora.
- Pacientes en tratamiento antibiótico: 6 hemocultivos en 48 horas, recogidos previos a la siguiente dosis de antibiótico.

D.- Identificación de las muestras

- En cada uno de los frascos, pegar la etiqueta del nombre del paciente en la zona de color, de forma que respete el código de barras.
- ROTULAR LOS FRASCOS con 1ª, 2ª ó 3ª extracción (recuadro).

-
- RESPETAR EL CÓDIGO DE BARRAS (No escribir ni poner la pegatina de identificación del paciente, inutiliza el frasco).

E.- Estudios especiales

- **El estudio de hongos, *Brucella* y tularemia, así como la sospecha de endocarditis deben ser reflejados específicamente en el volante de petición.**

- MICOBACTERIAS :

- **Indicado sólo en pacientes inmunodeprimidos.**
- **Seguir las instrucciones de asepsia indicadas.**
- **Mediante punción venosa extraer 5 ml de sangre e introducirla en tubos con heparina litio (tubos de extracción de sangre de tapón verde (referencia del hospital: 410463), nunca con EDTA. Invertir suavemente el tubo 2-3 veces.**
- **Se realizarán de 2 a 3 extracciones por paciente, con intervalo de 15-30 minutos.**
- **Conservar a temperatura ambiente hasta ENVÍO INMEDIATO una vez realizada la última extracción.**
- **Especificar claramente en el volante de petición la solicitud de cultivo de micobacterias.**

F.- CONSERVACIÓN

- **Enviar las muestras inmediatamente al Laboratorio. Si no es así conservar:**
- **< 2 horas: a temperatura ambiente.**
- **>2 horas: a 37 °C (estufa situada a la entrada del Laboratorio de Microbiología).**
- **NUNCA DEJAR EN NEVERA.**

G.- HEMOCULTIVOS POR CATÉTER

- **Sólo se realizará la extracción de sangre a través de catéter en el caso de sospecha de bacteriemia por catéter, **acompañado** de hemocultivos de sangre**

periférica, indicando claramente en los frascos y volantes el punto de extracción (catéter o vena).

BacT/ALERT 3D: PROCEDIMIENTOS BÁSICOS

En este anexo vamos a reflejar las funciones básicas a realizar con el aparato de hemocultivos a las que hemos hecho mención en el texto. Otros aspectos del sistema aparecen recogidos en el Manual del Operador del aparato. Nuestro sistema automático es el BacT/ALERT, modelo 3D, que consta de 1 módulo de control, y 2 módulos de incubación (8 cajoneras, 4 por módulo de incubación), en la actualidad gestionado por el laboratorio BioMérieux.

Como ya hemos indicado se trata de un sistema automático no invasor, de agitación y monitorización continua de cada frasco de hemocultivo. Utiliza un sensor colorimétrico y luz reflejada para detectar la presencia y producción de dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo. El CO₂ producido por el crecimiento microbiano determina que el sensor colorimétrico permeable al gas situado en el fondo de los frascos cambie de color azul verdoso a amarillo. Este cambio de color se refleja en un aumento de las unidades de reflectancia controladas por el sistema. El sistema registra las lecturas cada 10 minutos.

1. CARGAR FRASCOS

- ❑ Antes de introducir los frascos, ir a la pantalla principal (tiene el nº1 en el margen superior izquierdo) y presionar el icono de "cargar frascos" (icono azul con una botella de contorno blanco) en la parte inferior de la pantalla.
- ❑ Inmediatamente cambia la pantalla (pantalla principal modo de carga) indicando el número de celdas libres disponibles en la parte inferior de cada cajón del icono Instrumento.
- ❑ Se encenderá el/los pilotos verdes en el/los cajones que tengan celdas libres.
- ❑ Comprobar que el campo identificador del frasco (botella blanco) esté en blanco.
- ❑ Pasar el frasco por el lector de código de barras que está en la parte inferior del módulo de control. En caso de no leer el código de barras, se puede introducir manualmente con ayuda del teclado del módulo de control, el cual se extrae presionando dos pestañas laterales.

- ❑ También se puede reetiquetar, teniendo en cuenta que las etiquetas son genéricas, por tanto cuando se utilicen es necesario especificar a que tipo de hemocultivo corresponde el frasco:
 - Pasar el frasco reetiquetado por el lector del código de barras.
 - En la parte inferior izquierda de la pantalla aparecerá una ventanilla, encima del campo identificador del frasco.
 - Con las flechas ir buscando hasta encontrar el tipo de hemocultivo al que corresponda el frasco.
- ❑ Introducir los frascos en cualquier celda libre (luz verde). Una vez metido el frasco la luz verde parpadea.
- ❑ Pulsar el botón de verificar (validar ✓).

2. CAMBIO TIEMPO MÁXIMO DE ANÁLISIS (FRASCOS INDIVIDUALES)

- ❑ En el momento de la carga:
 - Presionar el icono de cargas botellas.
 - Pasar el frasco por el lector de código de barras.
 - Presionar el icono de tiempo de incubación (botella con un reloj en el interior).
 - Aparece una pantalla nueva. Con ayuda de las flechas se cambia el tiempo de incubación.
 - Indicar el tiempo total requerido.
 - Verificar (✓).
 - Introducir el frasco
 - Verificar (✓).
 - El cambio del tiempo máximo de análisis de un frasco durante la carga no afecta a ningún otro frasco del mismo tipo.

- ❑ Después de la carga:

- Acceder a la pantalla de configuración pulsando el botón de pantalla siguiente en la pantalla principal (→/ parte inferior derecha).
- Introducir la contraseña (de fábrica 1234) y presionar el icono final (llave).
- Acceder a la pantalla editar datos de un frasco específico (Icono: libro con una botella).
- Escribir el identificador del frasco, en la parte superior (icono botella en blanco); si se conoce la posición de la celda, utilizar los botones de desplazamiento, módulo de incubación, cajón y celda para seleccionarlo.
- Pulsar el botón verificar(✓).
- Aparecerá la pantalla Editar datos del frasco (identificador de pantalla 2.11.1)
- Modificar el tiempo (icono botella con reloj).
- Pulsar el botón verificar(✓).

3. EXTRACCIÓN DE FRASCOS

3.1. FRASCOS POSITIVOS.

- Cuando hay frascos positivos el fondo de la pantalla principal se pone amarillo y el del icono azul.
- Presionar botón de extracción de frascos positivos (icono azul que tiene una botella con una cruz positiva, parte superior de la pantalla). Encima de él aparece el número de frascos positivos.
- Se enciende una luz verde en los cajones que contienen frascos positivos.
- Abrir el/los cajones indicados. La/s celda/s del/os frasco/s a retirar se indica con una luz verde.
- Retirar uno de los frascos indicados. El indicador luminoso de la celda parpadeará lentamente para indicar la extracción del frasco. Aparecerá en la pantalla el identificador del frasco (código de barras) y el tipo de frasco.
- No es necesario volver a escanear el código de barras. No obstante si se hace verificará la identidad del frasco.
- Una vez sacados todos, el fondo del icono se torna otra vez gris.
- Asegurarse que todos los cajones están cerrados y pulsar el botón de verificar (✓)

□ **Imprimir informe de positivos:**

- Se realiza en el ordenador de tratamiento de datos, mediante el programa BacT/VIEW.
- Pulsar en los icono “entrar”(pantalla táctil). Pide clave: poner HC y aceptar con OK o intro. Da los buenos días, aceptar.
- Se colorearán los iconos situados en la parte derecha de la pantalla. Dar al icono de gestion de datos.
- Aparece una pantalla con tres bloques: datos del paciente, datos de la muestra y datos de la botella.
- En datos de la botella, pulsar el icono con botellas.
- Dar a IMP-INFORME.
- Introducir el código de barras con el lector.
- Aceptar con OK
- Imprime el informe con el status, código de barras de la botella positiva, tipo de botella y datos relativos a la fecha y hora de determinación. En este informe se anotará el número de muestra que figura en el frasco. Se buscará el volante correspondiente a dicho número y se comprobará que coincide el código de la botella con el adherido al volante.

3.2. FRASCOS NEGATIVOS

- Presionar botón de extracción de frascos negativos (icono azul que tiene una botella con un signo de negación). Encima de él aparece el número de frascos negativos.
- Se enciende una luz verde en los cajones que contienen frascos negativos
- Abrir el/los cajones indicados. La/s celda/s del/os frasco/s a retirar se indica con una luz verde.
- Retirar uno de los frascos indicados. El indicador luminoso de la celda parpadeará lentamente para indicar la extracción del frasco. Aparecerá en la pantalla el identificador del frasco (código de barras) y el tipo de frasco.
- No es necesario volver a escanear el código de barras. No obstante si se hace verificará la identidad del frasco.
- Una vez sacados todos, el fondo del icono se torna otra vez gris.

- Asegurarse que todos los cajones están cerrados y pulsar el botón de verificar (✓).

3.3. FRASCOS ANÓNIMOS

Los frascos cargados en el módulo de incubación sin acceder a la función Cargar frascos desde la pantalla principal se denominan frascos anónimos porque no tienen asociado un identificador (código de barras). En principio esto debe evitarse. Pero si por algún motivo ocurriera en la pantalla principal aparecerían:

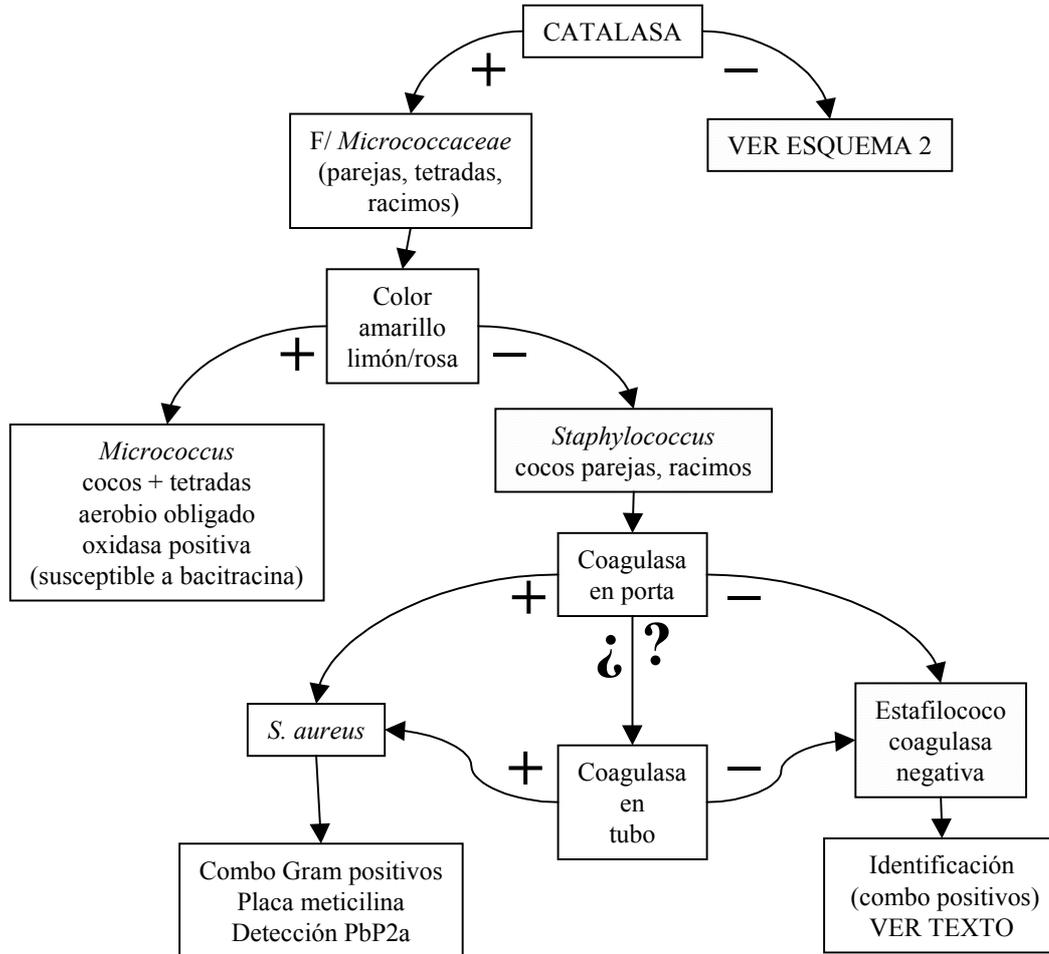
- Frascos anónimos negativos o provisionalmente negativos (icono azul que tiene una botella con un signo negativo, un signo de interrogación y un asterisco). Encima de él aparece el número de frascos negativos no identificados.
- Frascos anónimos positivos (icono azul que tiene una botella con una cruz positiva y un signo de interrogación). Encima de él aparece el número de frascos positivos no identificados
- Para extraer, presionar en el icono correspondiente. Se enciende una luz verde en los cajones que contienen frascos de la categoría presionada, iluminándose igualmente las celdas de los frascos con dicha categoría. El procedimiento es exactamente igual al de extracción de frascos positivos y negativos, pero debe escanearse o introducir manualmente el identificador del frasco, el cual quedará asociado al frasco extraído una vez que se extraiga el siguiente frasco o se pulse el botón verificar (✓). Si se va a volver a cargar el frasco (no ha finalizado el tiempo de incubación) se debe devolver inmediatamente a la celda que tiene el indicador luminoso parpadeando lentamente antes de extraer otro frasco. Una vez sacados todos, el fondo del icono se torna otra vez gris.
- Se puede también identificar un frasco anónimo, accediendo a Editar datos de los frasco:
 - Anotar la celda en la que se encuentra la botella anónima.
 - Acceder a la pantalla de configuración pulsando el botón de pantalla siguiente en la pantalla principal (→/ parte inferior derecha).
 - Introducir la contraseña (de fábrica 1234) y presionar el icono final (llave).

- **Acceder a la pantalla editar contenidos de las celdas (Icono, libro con un círculo).**
- **Localizar el cajón y el módulo de incubación por medio de los botones situados en la parte inferior. Tocar el icono de Celda apropiado. Aparecerá la pantalla editar datos del frasco (identificador de pantalla será 2.12.1)**
- **Tocar el campo identificador del frasco (botella vacía); el campo se resalta en blanco.**
- **Introducir o escanear el código de barras.**
- **Pulsar el botón verificar(✓).**

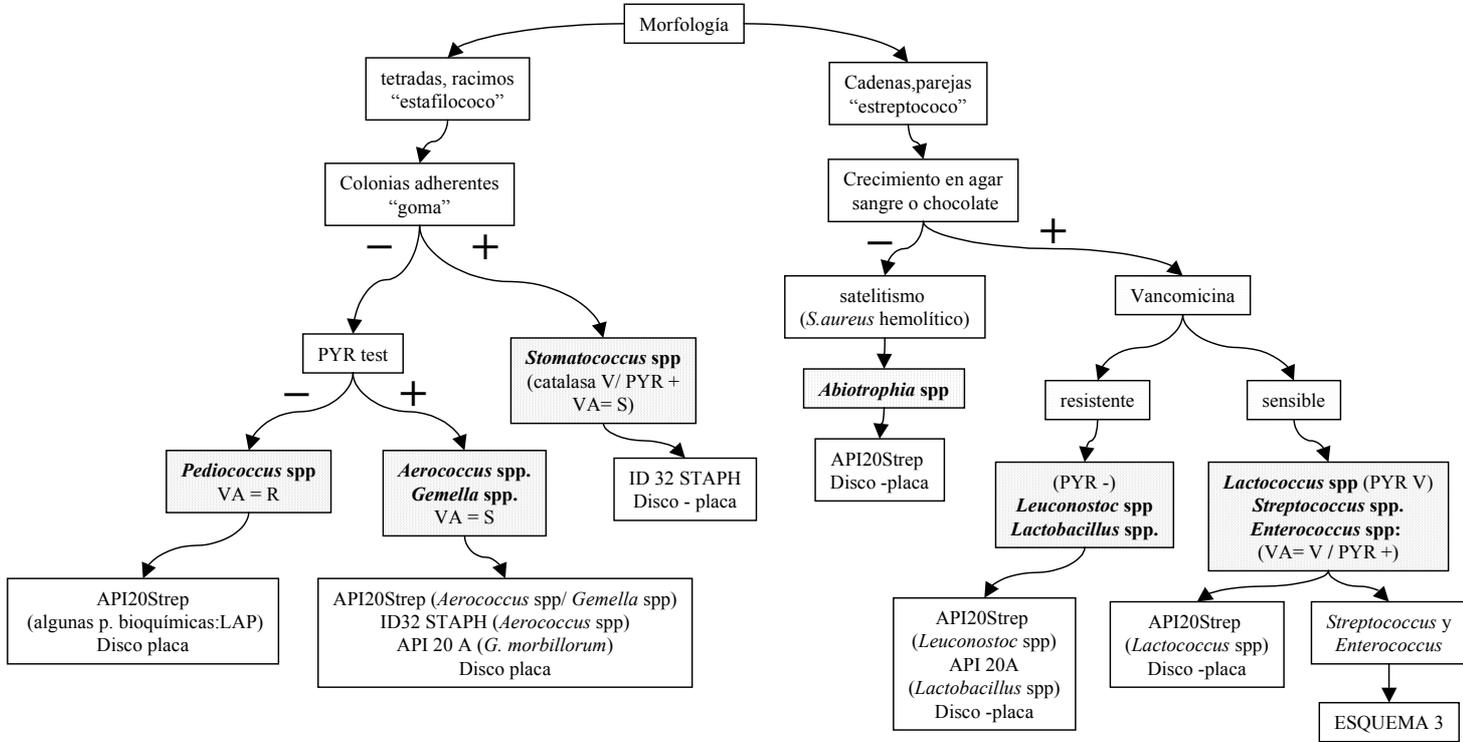
4. BÚSQUEDA DE DATOS DE UNA BOTELLA

- Se realiza en el ordenador de tratamiento de datos, mediante el programa BacT/VIEW.**
- Pulsar en los icono “entrar” (pantalla táctil). Pide clave: poner HC y aceptar con OK o intro. Da los buenos días, aceptar.**
- Se colorearán los iconos situados en la parte derecha de la pantalla. Dar al icono de gestion de datos.**
- Aparece una pantalla con tres bloques: datos del paciente, datos de la muestra y datos de la botella.**
- En datos de la botella, pulsar el icono con botellas.**
- Pasar la botella por el lector de código de barras.**
- En la parte derecha están 4 lupas que nos permiten acceder a toda la información de esa botella.**
- Si quisiéramos ver datos de otra botella, dar a F8 y escanear el código de barras de la nueva.**

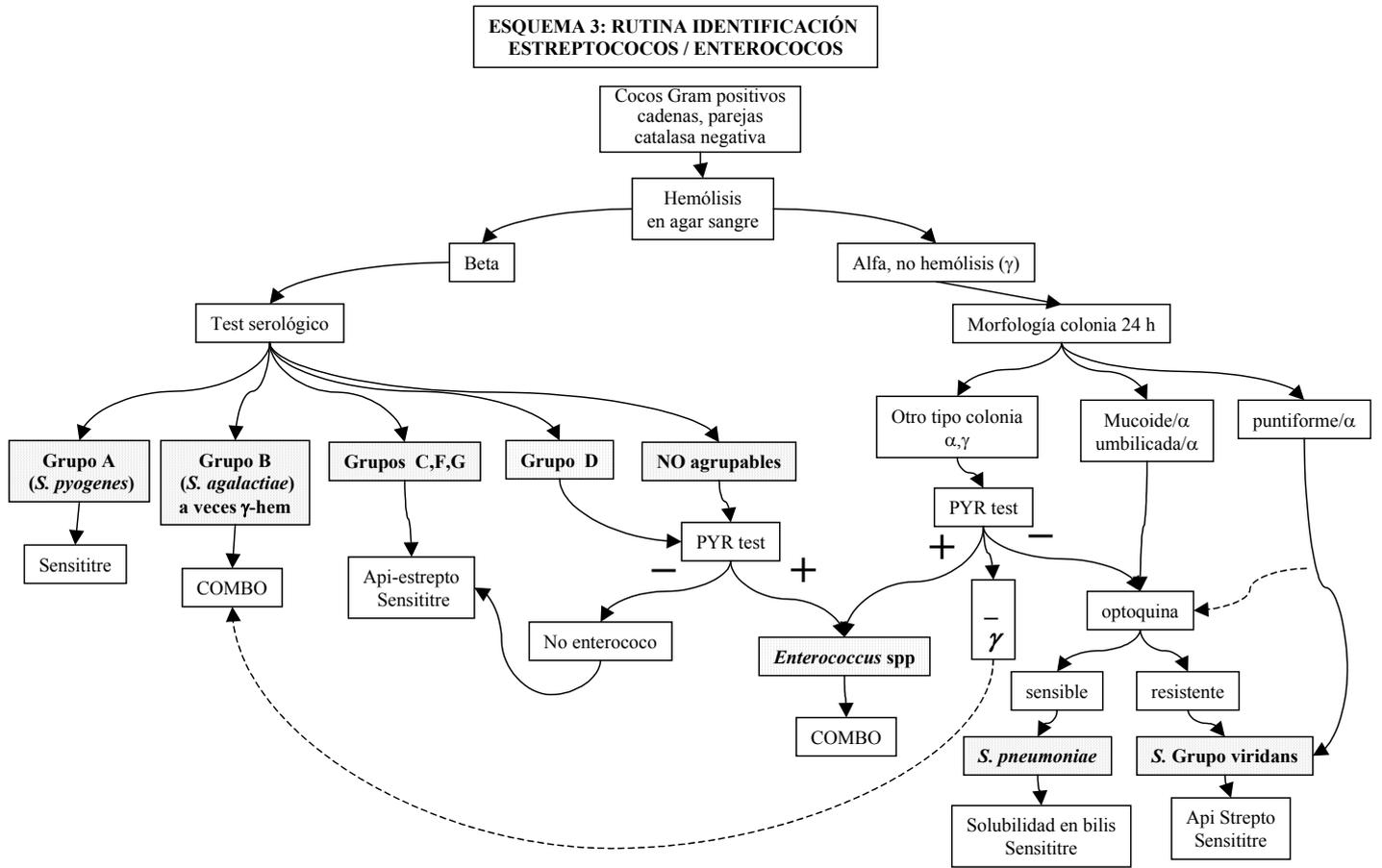
**ESQUEMA 1: RUTINA IDENTIFICACIÓN COCOS GRAM POSITIVOS
AEROBIOS/ANAEROBIOS FACULTATIVOS**



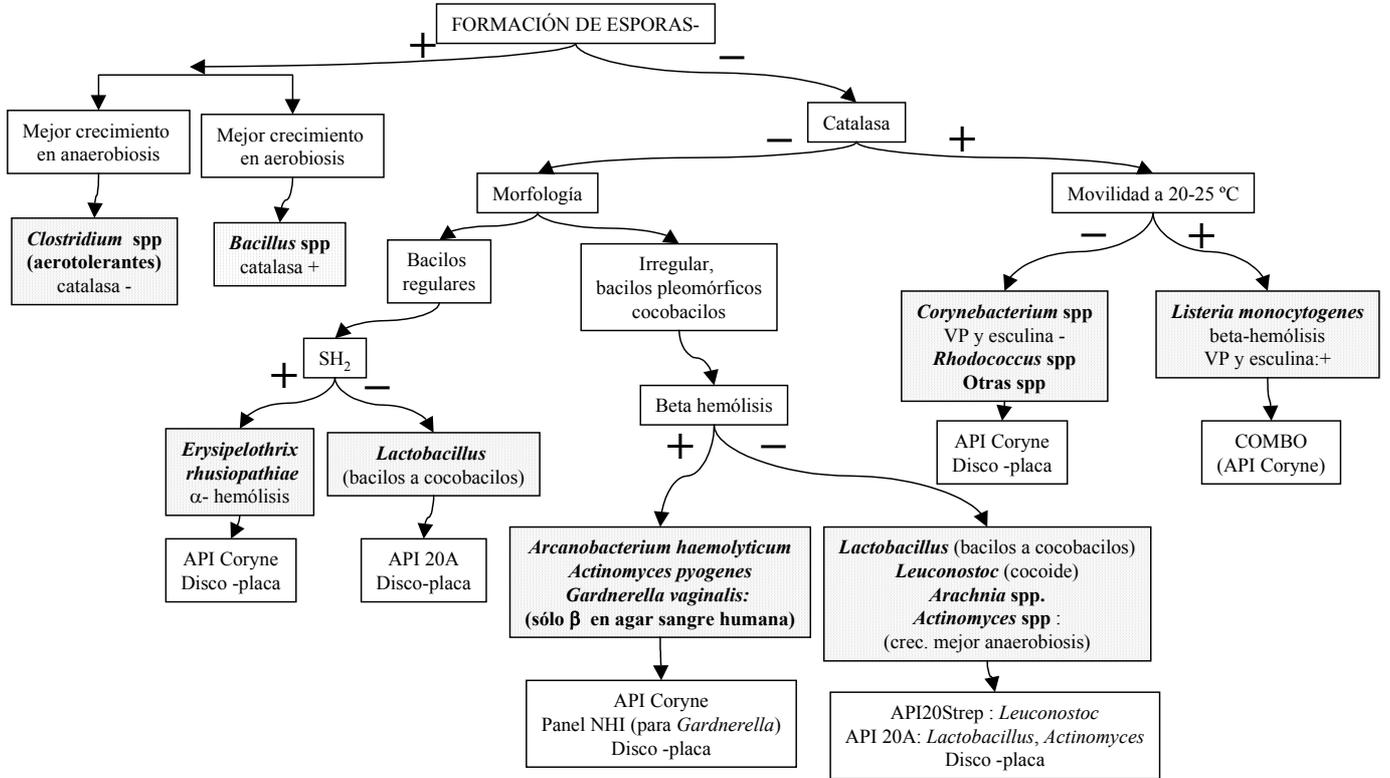
ESQUEMA 2 : RUTINA IDENTIFICACIÓN COCOS/COCOBACILOS GRAM POSITIVOS ANAEROBIOS FACULTATIVOS / CATALASA NEGATIVA



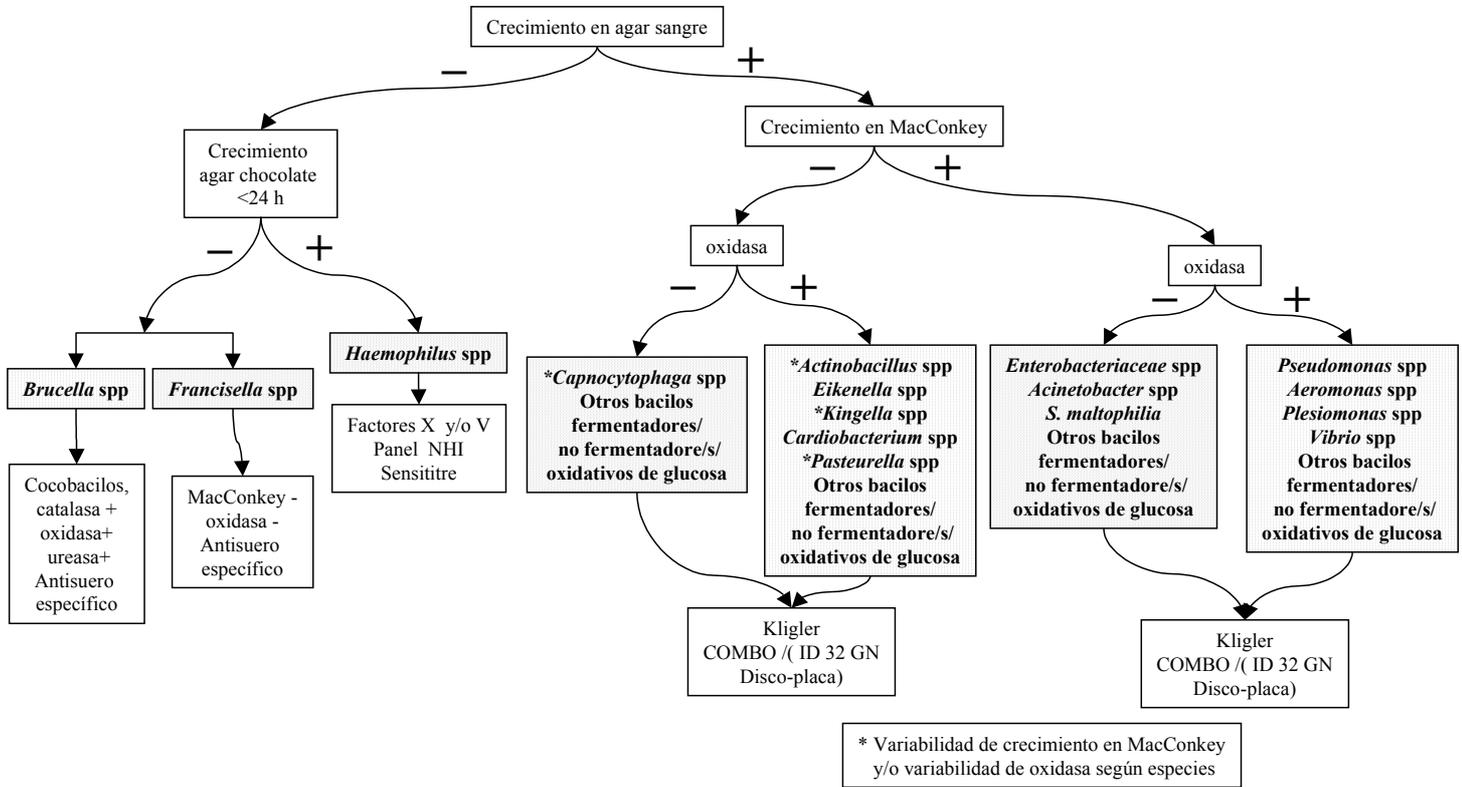
VA: Vancomicina (S=sensible/R=resistente) / PYR:pirrolidonilarilamidasa / LAP: leucina aminopeptidasa / V= variable



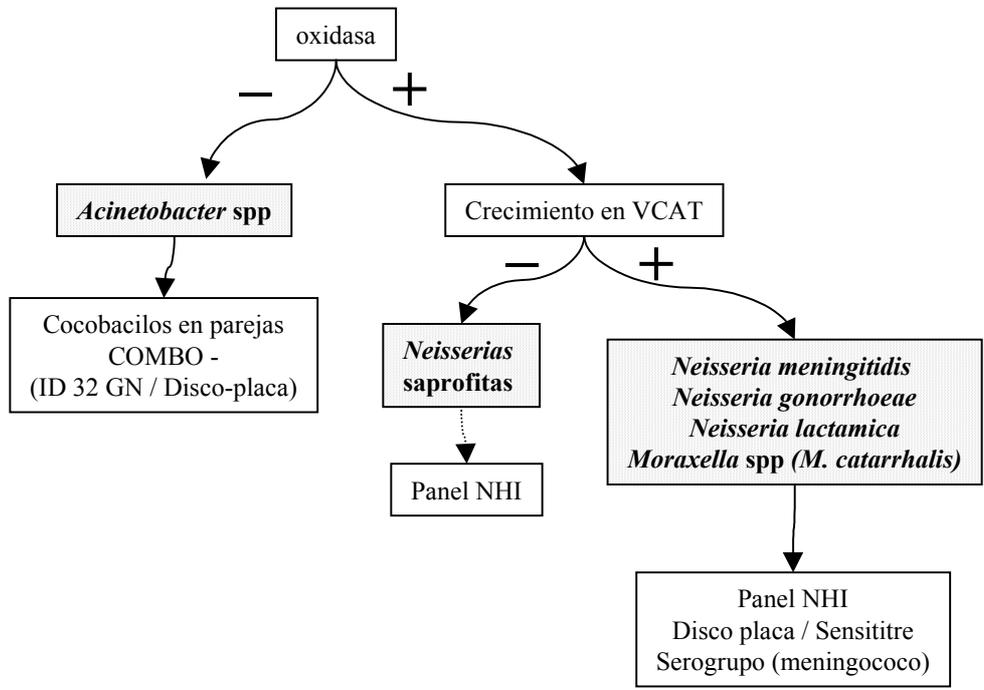
ESQUEMA 4: RUTINA IDENTIFICACIÓN BACILOS GRAM POSITIVOS
AEROBIOS/ANAEROBIOS FACULTATIVOS



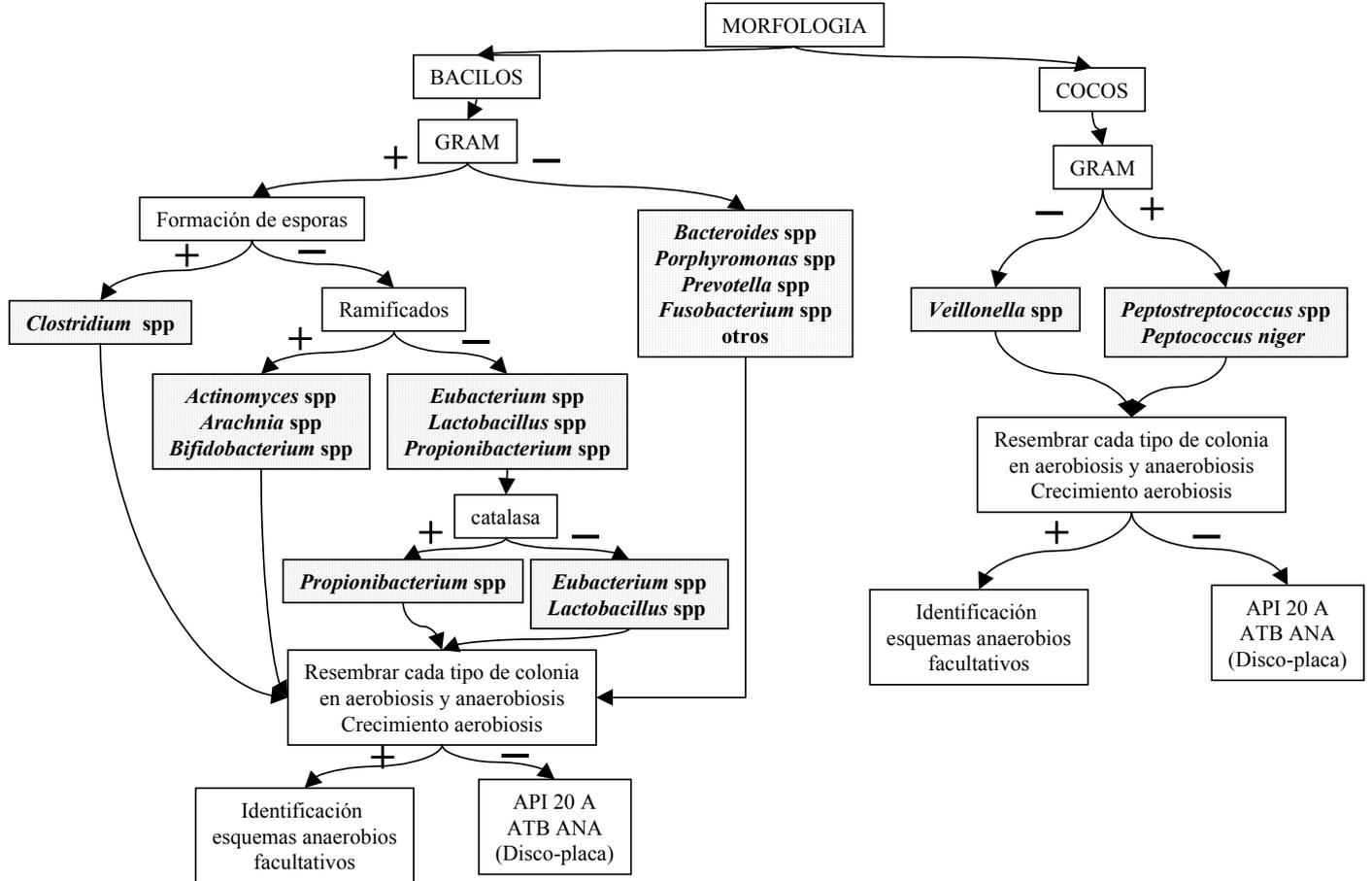
**ESQUEMA 5 : RUTINA IDENTIFICACIÓN BACILOS GRAM NEGATIVOS
AEROBIOS/ANAEROBIOS FACULTATIVOS**



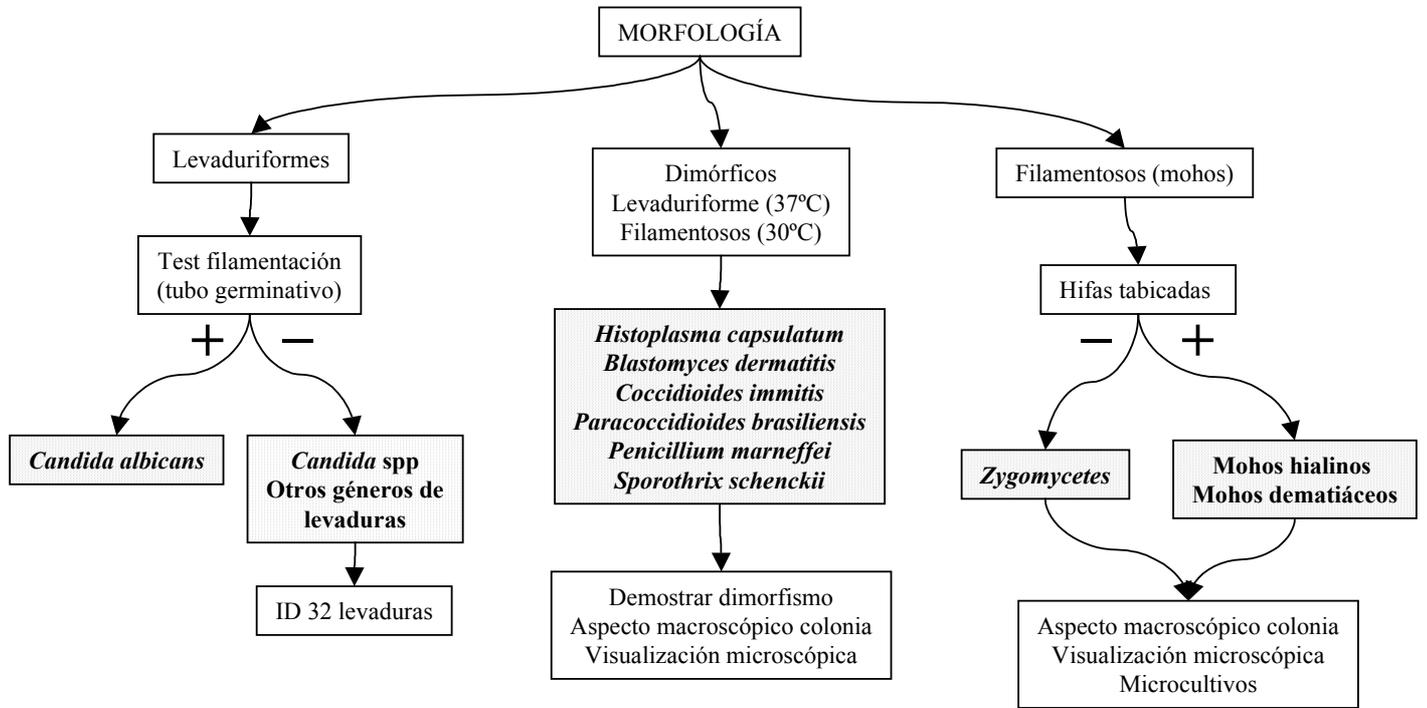
**ESQUEMA 6: RUTINA IDENTIFICACIÓN
DIPLOCOCOS GRAM NEGATIVOS AEROBIOS**



ESQUEMA 7 : RUTINA IDENTIFICACIÓN ANAEROBIOS



ESQUEMA 8: RUTINA IDENTIFICACIÓN HONGOS



Estudio bacteriológico de la orina: urocultivo

ÍNDICE

	PÁGINA
PROPÓSITO Y ALCANCE	1
FUNDAMENTO	2
DOCUMENTOS DE CONSULTA	2
MUESTRAS	4
SOLICITUD	4
CRITERIOS DE RECHAZO Y ACCIONES A TOMAR	5
MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS	5
APARATOS Y MATERIAL	6
PROCEDIMIENTO HABITUAL	7
SIEMBRA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.CULTIVO CUANTITATIVO	7
SIEMBRA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.CULTIVO CUALITATIVO	8
INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	9
ANÁLISIS BIOQUÍMICO	9
LECTURA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	10
REGISTROS	12
OTRAS PETICIONES NO RUTINARIAS	13
OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS	14
RESPONSABILIDADES	14
ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO	14
LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO	14
BIBLIOGRAFÍA	15
ORGANIGRAMA	16

1. PROPÓSITO Y ALCANCE / OBJETIVO

Descripción del procesamiento de la orina para el diagnóstico microbiológico de las infecciones que afectan al aparato urinario, así como de la gestión y el registro de todos los datos que se deriven de su procesamiento.

2. FUNDAMENTO

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las causas más frecuentes de enfermedad infecciosa aguda.

El estudio microbiológico de la orina nos proporciona el diagnóstico etiológico y los resultados de las pruebas de sensibilidad que nos permitirán un tratamiento antibiótico adecuado.

Deben recogerse muestras para cultivo cuando se sospeche alguno de los siguientes síndromes: cistitis, pielonefritis, bacteriuria asintomática, prostatitis y sepsis de origen urinario.

Las bacterias más frecuentemente aisladas de pacientes con infecciones agudas no complicadas son *E. coli*, especies de *Klebsiella* y *Proteus mirabilis*. En pacientes hospitalizados y con infecciones urinarias complicadas además son frecuentes las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, otros bacilos gramnegativos no fermentadores, *Enterococcus* spp y levaduras.

Debido a la facilidad con que se contaminan las muestras de orina es extremadamente importante incidir en una adecuada recogida y transporte de la muestra así como en el envío rápido al laboratorio de Microbiología.

Una vez en el Laboratorio, la orina se siembra en los medios adecuados para la recuperación de los patógenos más frecuentes en nuestro medio, su posterior identificación y estudio de sensibilidad a antibióticos.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Manual de recogida, transporte y conservación de muestras.
- Manual de procesamiento de muestras.
- Manual de envío de muestras a los laboratorios de referencia.
- Protocolos de identificación bacteriana.
- Manual de Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica. (SEIMC).

4. MUESTRAS

Orina: Siempre que sea posible se realizará la recogida antes de administrar antimicrobianos. Las muestras de orina que llegan al laboratorio para ser procesadas pueden haber sido obtenidas:

- Por micción espontánea.

- Por punción suprapúbica.
- Punción renal y ureteral.
- A través de sonda.
- En bolsa adhesiva estéril. En niños que no controlan esfínteres. Se contaminan frecuentemente y los resultados obtenidos generalmente sólo son fiables si el cultivo es negativo.

Recogida: Consultar el manual de recogida, transporte y conservación de muestras de nuestro Servicio.

Recipiente: **La orina debe recogerse en un envase estéril de boca ancha, específico para recogida de orina (Ref; 417479). Presenta una tapa de rosca con un punto de inserción, cubierto con una etiqueta protectora, para aplicar a un tubo de vacío. Este tubo de vacío estéril es el que debe remitirse al laboratorio de microbiología.**

Volumen: 5-10 ml

Conservación: Enviar inmediatamente al laboratorio de microbiología para su procesamiento, si no fuera posible, refrigerar en nevera a 4 °C hasta un máximo de 24 horas.

5. SOLICITUD.

El estudio bacteriológico de la orina (urocultivo) es solicitado por el clínico en el **volante de petición** como **cultivo general**.

6. CRITERIOS DE RECHAZO Y ACCIONES A TOMAR:

- **Muestras o volantes deficientemente identificados.**

Contactar por teléfono con el servicio peticionario solicitando la correcta identificación. Si no fuera posible, se rechaza la muestra indicando en el informe la causa.

- **Muestras inadecuadas.** Se consideran:
 - **Orina enviada en envase no estéril o mal cerrado.**
 - **Orina mezclada con heces.**

- **Punta de sonda (catéter Foley).**
- **Orina procedente de bolsa colectora.**
- **Orina conservada en estufa o a temperatura ambiente >2 horas.**

RECHAZAR estas muestras. Anotar en el volante el motivo del rechazo. Adjuntar una copia de instrucciones de recogida y enviarlo al medico solicitante.

Registrar la causa del rechazo en el registro de incidencias del área de recepción de muestras.

6. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

a. Medios de cultivo: Deben estar almacenados entre 2-8 °C

Se emplean dos tipos de medios, selectivos y no selectivos. La asociación de agar sangre con agar MacConkey generalmente es suficiente para recuperar los microorganismos más frecuentemente implicados en ITU. En ocasiones puede ser necesario sembrar un medio selectivo para bacterias gram positivas como por ejemplo CNA (agar sangre con colistina y ácido nalidíxico) u otro medio diferencial como agar CLED.

b. Referencias de medios, reactivos y productos.

Tabla 1: Medios empleados en la detección y cuantificación de uropatógenos

Medio	Casa comercial	Referencia
Agar tripticasa soja + 5% sangre	BioMerieux	43001
Agar MacConkey	BioMerieux	43141
Agar CLED	Oxoid	PP00301
Agar CNA	BioMerieux	43071

Tabla 2 : Reactivos empleados en la identificación y pruebas de sensibilidad de uropatógenos

Reactivo	Casa comercial	Referencia
Tiras reactivas: combour RL-10	Roche	1379208
Reactivos Gram	Soria Meguizo	Violeta: 999802 Yodo: 997235 Safranina: 996501
Peroxido de hidrógeno 30%	Foret	Pedir a Farmacia
Slidex Staph Plus	BioMerieux	73115
Coagulasa	BBL	0803
Detección SARM	Denka Seken	1096
PYR	Mast Diagnostics	417321
Slidex Strepto Kit	BioMerieux	58810
Oxidasa	Mast Diagnostics	371021
Panel Combo Gram positivos 1S	Dade Behring	B-1016-75
Panel Combo Gram orina 1S	Dade Behring	B-1016-82
ID32 GN	BioMerieux	414306
ID 32 Levaduras	BioMerieux	32200
API Coryne	BioMerieux	412683

Para referencias de otros reactivos, ver listado general del Laboratorio de Microbiología

7. APARATOS Y MATERIAL

- Estufa a 37°C atmósfera aerobia.
- Estufa a 30 °C (levaduras).
- Neveras a 4°C (muestras y medios).
- Mditron M (análisis bioquímico de la orina). Boehringer Mannheim®.
- Microscopios.
- Lector microScan, autoScan 4® Dade- Berhing.
- Sistema informático. Programa Aramis® Dade- Berhing.
- Asas estériles calibradas de 0,01 ml.
- Material fungible de soporte propio del Laboratorio de Microbiología.

8. PROCEDIMIENTO HABITUAL

- a. Numerar y registrar las muestras de orina (P).

- b. *Atemperar los medios de cultivo.*
- c. *Rotular las placas de medios de cultivos con el número y la fecha.*
- d. *Siembra de medios de cultivo.*
- e. *Incubar los medios de cultivo sembrados.*
- f. *Análisis bioquímico.*
- g. *Lectura de los medios de cultivo.*
- h. *Registros.*

Siembra de medios de cultivo

En el estudio microbiológico de la orina se realiza cultivo cualitativo y cuantitativo.

Cultivo cuantitativo

- **Objetivo:** calcular el número de microorganismos existentes por ml de orina para poder conferir significación o no a los resultados obtenidos (sistema de recuento).
- **Medios:** agar-sangre, CLED u otros medios enriquecidos que permitan el crecimiento de la mayoría de los microorganismos causantes de infecciones urinarias.
- **Método:**
 1. Agitar suavemente la muestra
 2. Sumergir perpendicularmente a la base del recipiente, un asa calibrada de 0.01 ml (10 µl) en la muestra de orina no centrifugada.
 3. Practicar una sola estría en el centro de la placa del medio de cultivo.
 4. Diseminar el inoculo uniformemente en ángulo recto respecto a la estría primaria.
 5. Girar la placa 90° y extender el inoculo hasta cubrir toda la superficie del agar.

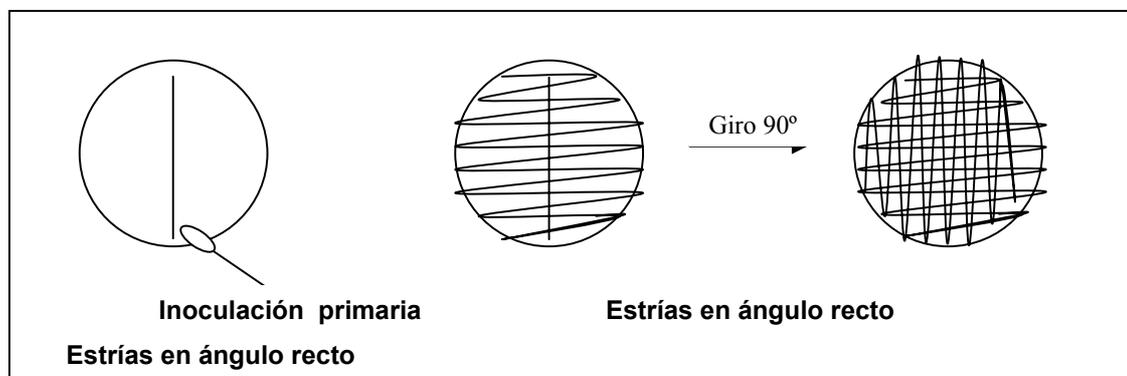


Figura 1: Técnica de inoculación cuantitativa o de recuento.

Cultivo cualitativo

- **Objetivo:** obtener colonias aisladas del/los microorganismo/s presentes en la orina. Esto nos permitirá valorar la calidad de la muestra (descartar orinas contaminadas) y realizar las pruebas de identificación y estudios de sensibilidad a antibióticos (sistema de aislamiento).
- **Medios:** MacConkey o EMB u otros medios selectivos que permiten el crecimiento de enterobacterias, ya que a esta familia pertenecen los microorganismos que con mayor frecuencia se aíslan en las infecciones urinarias.
- **Método:**
 1. Descargar el asa en un cuadrante de la placa.
 2. Girar la placa 90 °.
 3. Con el mismo asa, tocar sólo ligeramente el inoculo inicial para realizar las primeras estrías del segundo cuadrante.
 4. De la misma forma inocular el tercer cuadrante.
 5. En el último cuadrante realizar estrías más anchas para asegurar el aislamiento de colonias.

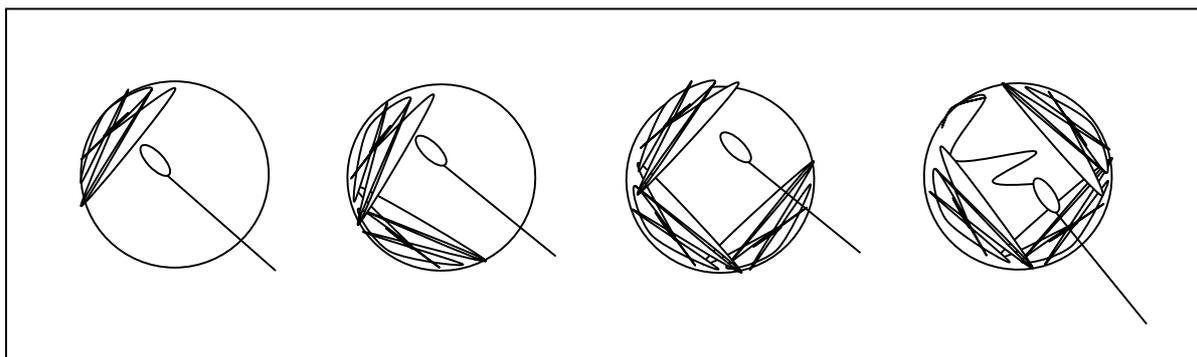


Figura 2: Técnica de inoculación cualitativa o aislamiento.

Incubación de los medios de cultivo sembrados

Colocar las dos placas sembradas con la misma muestra, en orden creciente de numeración en los portaplacas.

El cultivo cualitativo y cuantitativo se incuban en las mismas condiciones: **a 37°C en atmósfera aeróbica durante 18 a 24 horas.**

Análisis bioquímico.

Para ayudar en la interpretación de los hallazgos en los medios de cultivos, fundamentalmente en aquellos con recuentos bajos o con más de un tipo de microorganismos, a todas las orinas a las que se les solicita cultivo bacteriano se les realiza un análisis bioquímico.

Se lleva a cabo en el aparato Miditron M (Boehringer Mannheim®) utilizando tiras reactivas combour RL-10, Roche®. Seguir los pasos descritos en el protocolo de uso del aparato.

Son marcadores de ITU: piuria, nitritos y/o pH elevado.

Piuria: detección de leucocitos o de su enzima estearasa leucocitaria en orina. Se considera indicativa la presencia de 10 o más células por microlitro de orina sin centrifugar. Tiene una sensibilidad superior al 95 %, en los pacientes con cistitis, por lo que su ausencia obliga a considerar otro diagnóstico.

Nitritos: Proceden de la acción del enzima nitrato reductasa de las bacterias sobre los nitratos de los alimentos. Las bacterias deben permanecer en contacto con los nitratos alrededor de 4 horas para producir niveles detectables de nitritos. La prueba es específica, superior al 90 %, aunque algunos saprofitos contaminantes pueden dar falsos positivos, pero poco sensible inferior al 50 %, especialmente si la densidad de microorganismos es baja ($< 10^3$ UFC/ml) o el tiempo de permanencia de la orina en vejiga ha sido corto (inferior a 4 horas).

No producen nitrato reductasa, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* ni *Candida*.

PH elevado: ≥ 7 : Determinados microorganismos como *Proteus* spp y *Corynebacterium* spp poseen ureasa, enzima que desdobra la urea en amonio, alcaliniza la orina y eleva el pH.

Lectura de los medios de cultivo: Examen e interpretación de los urocultivos

OBJETIVO: Detectar, cuantificar, identificar y estudiar la sensibilidad a antimicrobianos de los microorganismos aislados en la orina.

MATERIAL NECESARIO

Para cada muestra procesada:

Medios de cultivo sembrados e incubados:

Agar Sangre. Siembra cuantitativa.

Agar MacConkey. Siembra para aislamiento.

Volante de petición, donde tenemos los datos de paciente, muestra y médico que pueden aportarnos información válida.**Resultados del análisis bioquímico,** del que valoramos:

Ph ≥ 7

Presencia de nitritos

Leucocitos ≥ 25 / μ l

- **Hoja de trabajo** donde reflejaremos las pruebas que hay que realizar a cada aislamiento
- **Reactivos necesarios para identificación y pruebas de sensibilidad.**

LECTURA

Examinar los cultivos que han sido incubados durante 18-24 horas.

Cultivos negativos: no hay crecimiento visible en ninguno de los dos medios

- Informar cultivo negativo, en orinas recogidas por micción espontánea o por catéter, cuando los parámetros bioquímicos son normales.
- Reincubar 24 horas más, si:
 - Las placas presentan un crecimiento que no permita discernir el aspecto de las colonias.
 - La muestra fue recogida por una técnica invasiva (punción suprapúbica).
 - El análisis bioquímico muestra $\text{Ph} \geq 7$ y/o leucocituria.

Cultivos contaminados: Ocurre cuando hay presencia de bacterias en la orina que no proceden del tracto urinario (periné), provocada por mala recogida, uso de contenedores inadecuados o conservación incorrecta.

En general, se considera contaminación la presencia más de 2 tipos de microorganismos. Hay que tener en cuenta la posibilidad de infección polimicrobiana en pacientes con ITUs complicadas (anomalías en aparato urinario), abscesos renales o portador de sonda permanente.

Cultivos positivos.

1. Cuantificación:

Observar en las placas la morfología de las colonias, para comprobar cuantos tipos de colonias han crecido:

Cuando hay **cultivo puro** de un tipo de colonia, cuantificar y si procede, realizar identificación y antibiograma.

Cuando hay crecimiento de **dos tipos de colonias** cuantificar ambas y valorar teniendo en cuenta el nº de colonias de cada tipo, el mecanismo de obtención de la muestra y los datos bioquímicos de la misma.

En general, si hay **más de 2 dos tipos**, informar: "**Orina contaminada, envíen nueva muestra**".

Manera de realizar el recuento:

Como se han sembrado 0,01ml de orina (1ml/100) en cada placa, el nº de colonias que crezcan en AS son la expresión del nº de UFC que hay en cada uno de los 0,01ml de orina.

Para conocer el nº de UFC que hay en 1ml (UFC/ml), multiplicamos el nº de colonias crecidas en AS X 100.

Interpretación del recuento:

- $\geq 10^2$ **UFC/ml.** Valor en:
 - Mujeres con disuria/polaquiuria: BGN en cultivo puro.
 - Orina obtenida por punción suprapúbica: Cualquier microorganismo crecido.
 - Fluido prostático (prostatitis).
- $\geq 10^3$ **UFC/ml.** Valor en:
 - Varones sintomáticos.

Levaduras.

Determinados Cocos gram positivos.

Control postratamiento.

- $\geq 10^4$ UFC/ml Valor en:

Orina obtenida por catéter: Hasta dos especies. Si se observan tres o más tipos de colonias: Orina contaminada, envíen nueva muestra.

Microorganismos de crecimiento lento: Levaduras

- $\geq 10^5$ UFC/ml. Valor en:

Todos los anteriores

Pielonefritis

Sonda permanente más síntomas de ITU. Al inicio de la infección pueden encontrarse recuentos menores

Bacteriuria asintomática, en 2 muestras sucesivas.

Dos especies aisladas en pacientes con síntomas de ITU.

2. Identificación de microorganismos y estudios de sensibilidad.

Las diferentes técnicas están especificadas en el manual "Técnicas" de nuestro laboratorio.

Enterobacterias: Panel Combo orina 1S. Dade-Behring®

- *Pseudomonas aeruginosa*: Aspecto característico. Oxidasa positiva. Panel Combo orina 1S. Dade-Behring®
- Bacilos gramnegativos no fermentadores: oxidasa positiva / negativa; Panel Combo orina 1S. Dade-Behring®
- *Enterococcus* spp. Catalasa: negativa; Panel Combo positivos Dade-Behring®
- *Streptococcus* grupo B (agalactiae). Catalasa negativa; Aglutinación (Slidex Strepto Kit)® positiva grupo B. Panel Combo positivos Dade-Behring®
- *Staphylococcus aureus*: Catalasa positiva; Coagulasa positiva; Sensibilidad a meticilina: positiva / negativa; Panel Combo positivos Dade-Behring®
- *Staphylococcus* coagulasa negativa: Catalasa positiva; Coagulasa negativa; Panel Combo positivos Dade-Behring®
- Levaduras:
 - Candida albicans*: test de filamentación positivo
 - Candida* spp: test de filamentación negativo. Identificación de especie: ID 32 bioMerieux

Registros

Si no se observa crecimiento: anotar "NEGATIVO" en el volante de petición y pasar a secretaría para registro.

Si se observa crecimiento:

- Si hay **más de 2 dos tipos**, anotar en el volante de petición: Orina contaminada y pasar a secretaría para registro.
- Cuando se procede a identificación y antibiograma anotar en el volante de petición "trabajando" y en la hoja de trabajo los pasos a seguir.

9. OTRAS PETICIONES NO RUTINARIAS:

La investigación en orina de los siguientes agentes etiológicos sólo se realiza cuando el médico responsable lo solicita expresamente en el **volante de petición**.

➤ Estudio de bacterias anaerobias.

Solamente se buscarán si la orina se ha recogido por punción suprapúbica, o directamente de ureter o riñón.

Sembrar por aislamiento una placa de agar Schaedler (SC). Incubar en anaerobiosis 48 horas a 35°C.

➤ Estudio de micobacterias: Seguir los procedimientos específicos.

➤ Estudio de HONGOS. Sembrar por aislamiento una placa de **agar Sabouraud- Cloranfenicol** (el recuento lo hacemos de la placa de agar sangre). Incubar en aerobiosis 24 horas a 30°C.

➤ Estudio de parásitos:

Detección de *Trichomonas vaginalis* en varones. Centrifugar la orina, 2500 rpm, durante 10 minutos. Examinar el sedimento al microscopio. La observación de trofozoitos con flagelos móviles (axostylo y membrana ondulante) indica la presencia de *Trichomonas vaginalis*.

Otros parásitos: (huevos de *Schistosoma haematobium*, larvas de *Strongyloides stercoralis*). Aplicar la técnica específica para cada género parasitario.

➤ Estudio de VIRUS

CITOMEGALOVIRUS: se envía la muestra al Centro Nacional de Microbiología (Instituto Carlos III). Seguir las instrucciones del manual de envío de muestras a los laboratorios de referencia (P).

10. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Tanto las pruebas y resultados preliminares como los definitivos quedan registrados en las hojas de trabajo. Los resultados definitivos y los comentarios que el facultativo considere oportunos, son expresados en el "*informe definitivo*".

Informe definitivo: información de los resultados al médico solicitante:

- **Cultivo negativo.** No se observa crecimiento significativo en los medios de cultivo.

- **Cultivo contaminado.** Se pide siempre nueva muestra para descartar infección urinaria.
- **Cultivo positivo.** Informar:
Microorganismo con identificación a nivel de especie y sensibilidad.
Recuento del nº de colonias.

11. RESPONSABILIDADES.

Recogida de muestras: El servicio peticionario y el paciente.

Cultivo de la muestra: Auxiliares clínicas y facultativo responsable de la sección.

Lectura y procesamiento de las muestras: TEL o/y DUE y facultativo responsable de la sección.

Interpretación de los resultados e informe de los mismos: Facultativo responsable de la sección.

12. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Si por alguna circunstancia, no existe posibilidad de procesar inmediatamente las muestras, se refrigeran en nevera a 2-8 °C, independientemente del tipo de determinaciones a realizar.

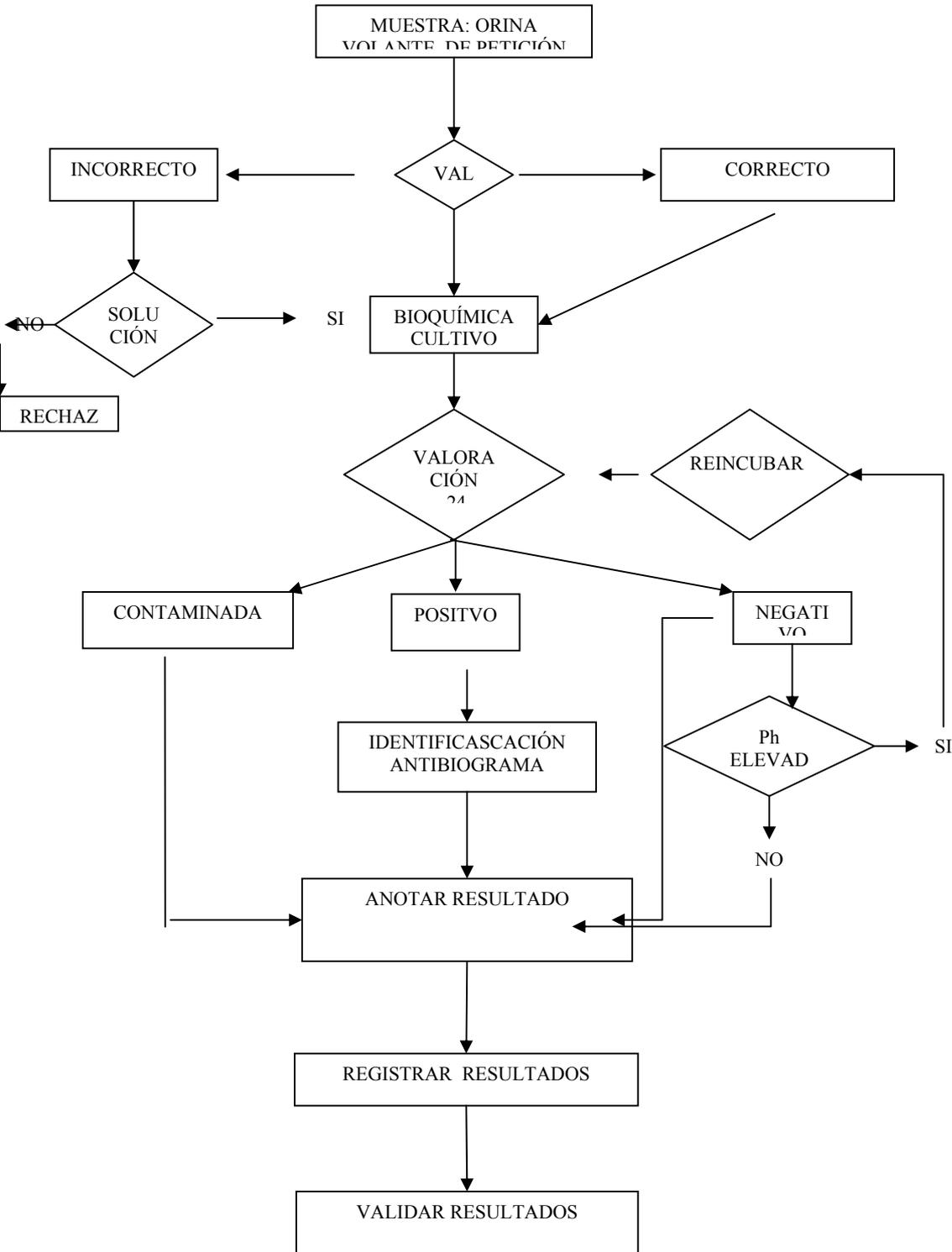
13. LIMITACIONES AL PROCEDIMIENTO

No procede.

14. BIBLIOGRAFÍA

- Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. ASM. Washington, 7ª edición 1999.
- Isenberg. Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM 1992.
- Koneman. Diagnostic Microbiology. Fifth edition. 1997
- La infección urinaria. Procedimientos en Microbiología Clínica, Nº14. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Henry D. Isenberg. Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM. Washington. 1992.

ORGANIGRAMA UROCULTIVO



**DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO (L.C.R.)**

**UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA
HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA, ZAMORA**

ÍNDICE

	PÁGINA
PROPÓSITO Y ALCANCE	3
FUNDAMENTO	3
DOCUMENTOS DE CONSULTA	4
RECEPCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS	4
EQUIPO Y MATERIALES	6
MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS	7
PROCEDIMIENTO HABITUAL	9
OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DEL RESULTADO	15
RESPONSABILIDADES	15
ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO	16
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	16
BIBLIOGRAFIA	16
ANEXO I: Gestión de la información en el laboratorio	17
ANEXO II: Principales agentes etiológicos de las infecciones del sistema nervioso central	18
ANEXO III: Protocolo de identificación microbiológica de los patógenos	19

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 3 de 26

I. PROPÓSITO Y ALCANCE / OBJETIVO

El objetivo de este documento es normalizar el procesamiento del líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) para el diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central (SNC), a través del estudio macroscópico, microscópico y microbiológico, así como la gestión y el registro de todos los datos que se deriven del procesamiento de la muestra. Su aplicación se extiende desde la obtención de la muestra hasta la identificación definitiva de los aislados.

II. FUNDAMENTO

Numerosas infecciones del sistema nervioso central pueden progresar con rapidez y producir la muerte o un daño irreparable en un breve periodo. De ahí, la importancia de la obtención de un diagnóstico etiológico rápido y exacto para un tratamiento adecuado. Uno de los cuadros clínicos más frecuentes es la meningitis bien bacteriana, vírica, fúngica o por parásitos. Para el diagnóstico de este tipo de cuadros, la muestra clínica más rentable es el líquido cefalorraquídeo, siendo además una muestra biológica de relativo fácil acceso y obtención.

En este documento se describirá exclusivamente el procesamiento de esta muestra, dado que la obtención de otros tipos de muestra requieren abordaje quirúrgico por el Servicio de Neurocirugía, servicio del que carece este hospital. Los enfermos que por cualquier circunstancia requieran para el diagnóstico etiológico, otro tipo de muestra, se trasladarán a los centros hospitalarios más cercanos que dispongan del Servicio de Neurocirugía.

Este protocolo recoge el esquema de procedimiento a realizar para el diagnóstico de meningitis causadas por bacterias, micobacterias, y por hongos. Las muestras procedentes de meningitis de origen vírico o por parásitos, son enviadas a un centro de referencia para su procesamiento, puesto que las técnicas empleadas escapan a la infraestructura del laboratorio de Microbiología del Hospital Virgen de la Concha.

En el Anexo II se recogen los microorganismos más frecuentemente implicados en la etiología de la meningitis.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 4 de 26

III. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Manual de recogida, transporte y conservación de muestras. (P)
2. Manual de procesamiento de muestras.
3. Protocolos de identificación bacteriana.
4. Manual de envío de muestras a los laboratorios de referencia.
5. Protocolo para la detección de antígenos en el L.C.R. de los microorganismos productores de meningitis.
6. Detección del antígeno criptocócico.
7. Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica (Procedimientos en Microbiología Clínica, SEIMC 2000).

IV. RECOGIDA DE MUESTRAS

Siempre que sea posible, se realizará la recogida de la muestra antes de la administración de antimicrobianos. **El L.C.R. se considera muestra urgente por lo que se procesará inmediatamente.**

Tipo de muestra:

- L.C.R. obtenido por punción lumbar: se obtiene según técnica estándar (P). Recoger la muestra en tres tubos estériles sin conservantes. Por lo general, el primer tubo se destina al estudio bioquímico, el tercero al estudio de células y el segundo al microbiológico. No obstante el tubo más turbio debe enviarse al Laboratorio de Microbiología.
- L.C.R. obtenido de reservorio: desinfectar el sitio de recogida.

Recipiente: tubo estéril sin conservantes (código almacén 410465).

Recogida de la muestra: El L.C.R. se obtiene mediante una punción lumbar por personal entrenado para ello y siguiendo las normas de asepsia. (Ver protocolo de "Recogida de muestras")

Volumen:

- El volumen mínimo requerido para el cultivo bacteriológico es de 1 ml.
- Si se solicita estudio de hongos, micobacterias y/o virus se requieren 2 ml más por cada estudio adicional que deba realizarse.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 5 de 26

Transporte y conservación:

- El L.C.R. debe enviarse inmediatamente al Laboratorio de Microbiología para su procesamiento. **Las muestras deben estar correctamente identificadas, junto con el volante de petición, indicando datos personales del enfermo, servicio donde se encuentra ingresado, número de cama, facultativo que solicita el estudio, o centro de salud. Sería aconsejable otra información adicional: sospecha clínica, enfermedad de base, tratamiento antimicrobiano...**
- Si no es posible el envío inmediato, mantener en estufa a 37 °C.
- Si esto no fuera posible, ***No refrigerar nunca*** a no ser que se solicite ***únicamente*** estudio de P.C.R. frente a micobacterias y/o virus.

Criterios de aceptación

El laboratorio de Microbiología determina, una vez recibida la muestra, si cumple los requisitos para ser procesada. Estos requisitos incluyen, entre otros:

- a) Correcta identificación de la muestra. Solo se rechazará el L.C.R., cuando sea imposible establecer la identidad del paciente.
- b) Tipo de muestra adecuada para la petición solicitada
- c) Condiciones adecuadas de transporte y conservación (Manual de recogida y transporte muestras del Laboratorio de Microbiología).

Criterios de rechazo

- **Dada la importancia de la muestra, cualquier incidencia que ocurra se debe intentar resolver para evitar su rechazo.**
 - Muestras incorrectamente identificadas
 - Muestras derramadas
 - Volante incompleto
 - Muestra enviada en envase o recipiente inadecuado (no estéril, contaminado a simple vista)
 - Muestra no conservada en las condiciones adecuadas

De cualquier forma, dada la importancia de la muestra, ante cualquier deficiencia del L.C.R. enviado (derrame, transporte inadecuado por falta de esterilidad del recipiente, etc.), la muestra se procesa

pero en el volante se indicará el incidente para su posterior evaluación.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 6 de 26

El Laboratorio de Microbiología dispone de un sistema para el registro de las incidencias en el que se recoge la muestra implicada, persona que la recibe, tipo de incidencia, persona en contacto del servicio solicitante, y si la muestra es o no procesada.

V. EQUIPOS Y MATERIALES

Para el procesamiento del L.C.R. son necesarios una serie de equipos básicos:

- Nevera para conservación del líquido cefalorraquídeo una vez procesado, por si fuera necesario su utilización para pruebas adicionales (aglutinación,...) y de los medios de cultivo y reactivos. (Control diario de la temperatura).
- Estufa de aerobiosis a 37°C para conservación de la muestra hasta su procesamiento (generalmente inmediato) y cultivo de algunos microorganismos.
- Estufa de CO₂ (5-10%) a 37°C para cultivo de aquellos microorganismos microaerófilos/capnófilos. (control diario de microaerofilia y temperatura).
- Microscopio óptico con objetivos de 10x, 40x, 100 x y ocular 10x (limpieza después de su utilización)
- Sistemas automáticos (MicroScan..) y semiautomáticos (API, ID32GN.....) para identificación de microorganismos y estudios de sensibilidad de antimicrobianos.
- Material fungible: asas desechables de inoculación, portaobjetos, cubreobjetos, pipetas Pasteur, papel de filtro, guantes...
- Pipetas automáticas de 10, 100 y 1000 µl.
- Sistema informático para el registro de muestras, recogida de datos del paciente, así como para la emisión del resultado, base de datos y un programa estadístico para estudios epidemiológicos posteriores y análisis de costes.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 7 de 26

VI. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los medios de cultivo necesarios para el procesamiento del L.C.R. se especifican en la tabla 1.

Medio de cultivo	Distribuidor/referencia	Código Hospital	Conservación	Observaciones
Agar tripticasa-soja+ 5% sangre	BioMerieux/43001	412694-31CC	4°C	Crecimiento no selectivo
Chocolate+ Polivitalex	BioMerieux/ 43101	412698-31CC	4°C	Crecimiento no selectivo
Chocolate+ Polivitalex+ VCAT2*	BioMerieux/43241	412699-31CC	4°C	<i>N. gonorrhoeae/meningitidis</i>
MacConkey	BioMerieux/ 43141	412689-31CC	4°C	Bacilos gramnegativos
Mueller-Hinton 5% sangre	BioMerieux/ 43321	412878-31CC	4°C	Pruebas de sensibilidad
Mueller-Hinton 2	BioMerieux/ 43301	417473-31CC	4°C	Pruebas de sensibilidad
Mueller Hinton-Chocolate	BBL/43544035	412670-31CC	4°C	Pruebas de sensibilidad
Sabouraud Glucosa-Cloranfenicol	Soria Melgizo/ 51078	417040-31CC	4°C	Hongos levaduriformes y filamentosos
Schaedler vita K1+ 5% sangre carnero	BBL/ 4354042	412668-31CC	4°C	Bacterias anaerobias
Agar MRSA	Becton Dickinson/254570	414947-31CC	4°C	Detección de resistencia a metilina
Agar CLED	OXOID/PPOO301	412802-31CC	4°C	Empleado para el control de pureza en bacilos gramnegativos para identificación y sensibilidad
Caldo BHI	BioMerieux/ 42081	410034-31CC	4°C	Medio de enriquecimiento

Tabla 1: Medios de cultivo necesarios para el procesamiento de L.C.R.

*VCAT: vancomicina, colistina, anfotericina B, trimetoprim

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 8 de 26

En la siguiente tabla (tabla 2) se especifican equipos comerciales empleados para el diagnóstico y para los estudios de sensibilidad.

Nombre comercial	Distribuidor/referencia	Código Hospital	Observaciones
Oxidase Test	Mast-Diagnostic/371021	414534-31CC	Identificación <i>Neisseria</i> / <i>Haemophilus</i> /BGN
PYR Test	Mast-Diagnostic/ET07	417321-31CC	Identificación de estreptococos
Disco cefinasa	BBL/31650	413955-31CC	Detección de la presencia de betalactamasa
API 20A	BioMerieux/2030	412936-31CC	Identificación de anaerobios
API Strep	BioMerieux/2060	412859-31CC	Identificación de <i>Streptococcus</i> spp.
API Coryne	BioMerieux/20900	412683-41CC	Identificación de <i>Corynebacterium</i> spp.
ID32 Stap Estafilococos	BioMerieux/32500	414308-31CC	Identificación de <i>Staphylococcus</i> spp.
ID32 Levaduras	Biomerieux/32200	414307-31CC	Identificación de hongos levaduriformes
ID32 GN	Biomerieux/32100	414306-31CC	Identificación de bacilos gramnegativos
Slidex pneumo kit	BioMerieux/5882-1	412864-31CC	Detección de antígeno neumocócico
Slidex Strepkit	BioMerieux/58810	412869-31CC	Detección de antígenos de estreptococos hemolíticos
Slidex Staph Plus	BioMerieux/73115	412872-31CC	Identificación de estafilococos coagulasa positivo
Coagulasa plasma EDTA	BBL/0803-46-5	413999-31CC	Identificación estafilococos coagulasa positivo
Desoxicolato sódico	Sigma/D6750	414967-31CC	Identificación de <i>S. pneumoniae</i>
Panel Haemophilus-Neisseria (HNID)	Dade Behring/B1012-10B	412850-31CC	Identificación <i>Haemophilus</i> spp./ <i>Neisseria</i> sp.
Screening MRSA	Denka Seken CO/K1096	4127443-31CC	Detección de gen <i>mecA</i> responsable de la síntesis de proteína PBP2a(resistencia a meticilina8
CRYPTO-LA TEST FUMOZE	FUMOAZE 5148	413754-31CC	Detección de antígeno criptocócico a partir de L.C.R. y suero
Slidex@meningite-Kit5	BioMerieux/58803	417118-31CC	Detección de antígenos de <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> A/B/C, <i>E. coli</i> K a partir de L.C.R.
<i>H. influenzae</i> antiserum type b	DIFCO/ 2236.50.1	414731-31CC	Detección de antígeno b de <i>H. influenzae</i>
<i>H. influenzae</i> antiserum type poli	DIFCO/ 2237.50.0	414732-31CC	Detección de antígenos de <i>H. influenzae</i>
Slidex@meningite StreptoB	BioMerieux/58831	417119-31CC	Detección de antígenos de <i>S. agalactiae</i>
Lector Microscan autoSCAN4	Dade Behring	-	Identificación y sensibilidad BGN, cocos grampositivos, <i>Listeria monocytogenes</i>
EMIZA <i>Haemophilus</i> / <i>Neisseria</i> / <i>Strep</i>	Dade Behring/ 772EMIZA4	413988-31CC	Sensibilidad de <i>Haemophilus</i> spp / <i>Neisseria</i> spp./ <i>Streptococcus</i> spp.
COMBO Gramnegativos	Dade Behring/B-1016-80	413883-31CC	Identificación y sensibilidad de Gramnegativos
COMBO Grampositivos	Dade Behring/B-1016-71	413882-31CC	Identificación y sensibilidad de Grampositivos
ATB ANA	BioMerieux/14269	413963-31CC	Estudio de sensibilidad en anaerobios

Tabla 2: Kits comerciales empleados para el diagnóstico y estudio de sensibilidad de microorganismos procedentes de L.C.R.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 9 de 26

VII. PROCEDIMIENTO HABITUAL

El esquema general a desarrollar será el siguiente:

FASE PREANALÍTICA: Obtención de la muestra, conservación, transporte y manipulación hasta su llegada al laboratorio. (P)

FASE ANALÍTICA: Incluye la recepción, procesamiento y emisión de los resultados.

- 2.1. Recepción de la muestra: (Anexo I)
- 2.2. Preparación de la muestra
- 2.3. Examen macroscópico y microscópico de la muestra (tinción de Gram)
- 2.4. Cultivo de la muestra
- 2.5. Incubación: procesamientos especiales
- 2.6. Examen de los cultivos, interpretación y aislamiento
- 2.7. Identificación de los aislamientos (Anexo III)
- 2.8. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana si procede

FASE POSTANALÍTICA: Procedimientos para la emisión de los informes analítico-clínicos

En cada informe analítico emitido por la UM debe constar:

- Identificación del laboratorio.
- Nombre y apellidos del paciente. Número de historia clínica
- Ubicación del paciente: Servicio y nº de habitación en ingresados. Centro de atención primaria en externos
- Fecha de nacimiento del paciente.
- Identificación del médico solicitante de los análisis.
- Identificación del servicio (GFH)
- Tipo de muestra. Fecha de recepción en el laboratorio de la misma
- Número de registro de la muestra asignado en el laboratorio
- Técnica aplicada a la muestra
- Resultados en las unidades o forma de expresión recomendado por la comunidad científica
- Identificación del responsable de la validación final del informe: Nombre y firma
- Fecha de emisión del informe analítico.

2.1. Recepción de la muestra: común para todas las muestras (Anexo I)

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 10 de 26

2.2. Preparación de la muestra:

- Una vez registrada la muestra y asignado un número de laboratorio, se deben seguir los pasos posteriores.
- Todos los pasos posteriores en el procesamiento de la muestra debe realizarse en campana de flujo laminar.
- Observación macroscópica de la muestra para identificar la presencia de pus, sangre, etc. Si la muestra es purulenta y hay suficiente, se debe separar una mínima cantidad y reservar en nevera por si fuera necesario realizar la detección de antígenos bacterianos o bien si son solicitados por el facultativo.

2.3. Cultivo de la muestra

- Centrifugar 5 minutos a 2.500 r.p.m. si se recibe más de 1 ml de muestra. Si es <1 ml, únicamente, agitar con vórtex.
- Aspirar el sobrenadante con una pipeta estéril, dejando aproximadamente 0.5-1 ml en el tubo. Reservar el sobrenadante si se solicita la determinación del antígeno criptocócico, o para otros estudios adicionales.
- Agitar el sedimento con vórtex para resuspenderlo, durante al menos 30 segundos.
- Atemperar los medios de cultivo.
- Rotular los medios y un portaobjeto con el número de muestra, fecha y la palabra "L.C.R."
- Inocular 1 ó 2 gotas con una pipeta Pasteur en los siguientes medios de cultivo. Extender la muestra en aislamiento con un asa calibrada.
- Se siembran los siguientes medios:

Medio de cultivo	Temperatura incubación	Tiempo de incubación	Ambiente
Agar Chocolate polivitaalex	35-37°C	24 h	5-10%CO ₂
Agar tripticasa soja+5% sangre	35-37°C	24 h	5-10%CO ₂
Caldo BHI (1)	35-37°C	24 h	Aerobiosis
Agar Sabouraud glucosa-cloranfenicol (2)	35-37°C	24 h	Aerobiosis

- (1) Tras la incubación de 24 horas se realizará un pase a agar chocolate y agar sangre y se incubará otras 24 h.
- (2) La siembra en este medio se realizará previa petición expresa del doctor solicitante.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 11 de 26

2.4. Examen microscópico: Tinción de gram

- Una vez inoculados los medios de cultivo, se procederá a:
 - Rotar hisopo por portaobjetos y dejar secar.
 - Tinción de Gram (**P**)
- Se analizarán los siguientes datos:
 - Presencia o ausencia de leucocitos polimorfonucleares/ histiocitos/macrófagos
 - Presencia de bacterias/levaduras: estreptococos, bacilos grampositivos, bacilos/cocos gramnegativos
 - Determinación de la necesidad de realizar más estudios o investigaciones especiales.

Si la tinción de gram es positiva, se informará **de inmediato** al facultativo para que tome las medidas necesarias (modificación del tratamiento empírico, solicitud de otras pruebas adicionales, medidas de aislamiento...)

2.5. Incubación: procesamientos especiales

La investigación en L.C.R. de los siguientes microorganismos solamente se realizará si el facultativo responsable lo solicita expresamente en el volante.

1. ESTUDIO DE HONGOS:

- Sembrar el sedimento en Agar Sabouraud e incubar a 25°-30°C, en aerobiosis durante 24 horas. Si es negativo, reincubar 24 horas más.

2. ESTUDIO DE CRIPTOCOCCUS NEOFORMANS

- Sembrar el sedimento en Agar Sabouraud e incubar a 25°-30°C, en aerobiosis durante 24 horas. Si es negativo, reincubar 4 días más (Anexo III)
- Detección de antígeno capsular mediante aglutinación (**P**).

3. ESTUDIO DE ANAEROBIOS

- Sembrar el sedimento en Agar Schaedler e incubar a 35-37°C, en anaerobiosis durante 48 horas

4. ESTUDIO DE NOCARDIAS

- No se precisa ningún medio especial. Sólo debe anotarse en la placa de agar sangre rutinario la palabra "Nocardia" para prolongar la incubación durante 6 semanas (Anexo III), y sembrar agar Sabouraud sin antibióticos

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 12 de 26

5. **DETECCIÓN DE ANTÍGENOS EN EL L.C.R.: (P)**

Sólo se realiza en las siguientes circunstancias:

- Por solicitud expresa del médico responsable.
- Cuando se sospeche una meningitis bacteriana y en la tinción de Gram se observen microorganismos (para realizar el diagnóstico presuntivo) o un gran número de leucocitos en ausencia de bacterias.

2.6. Examen de los cultivos, interpretación y aislamiento

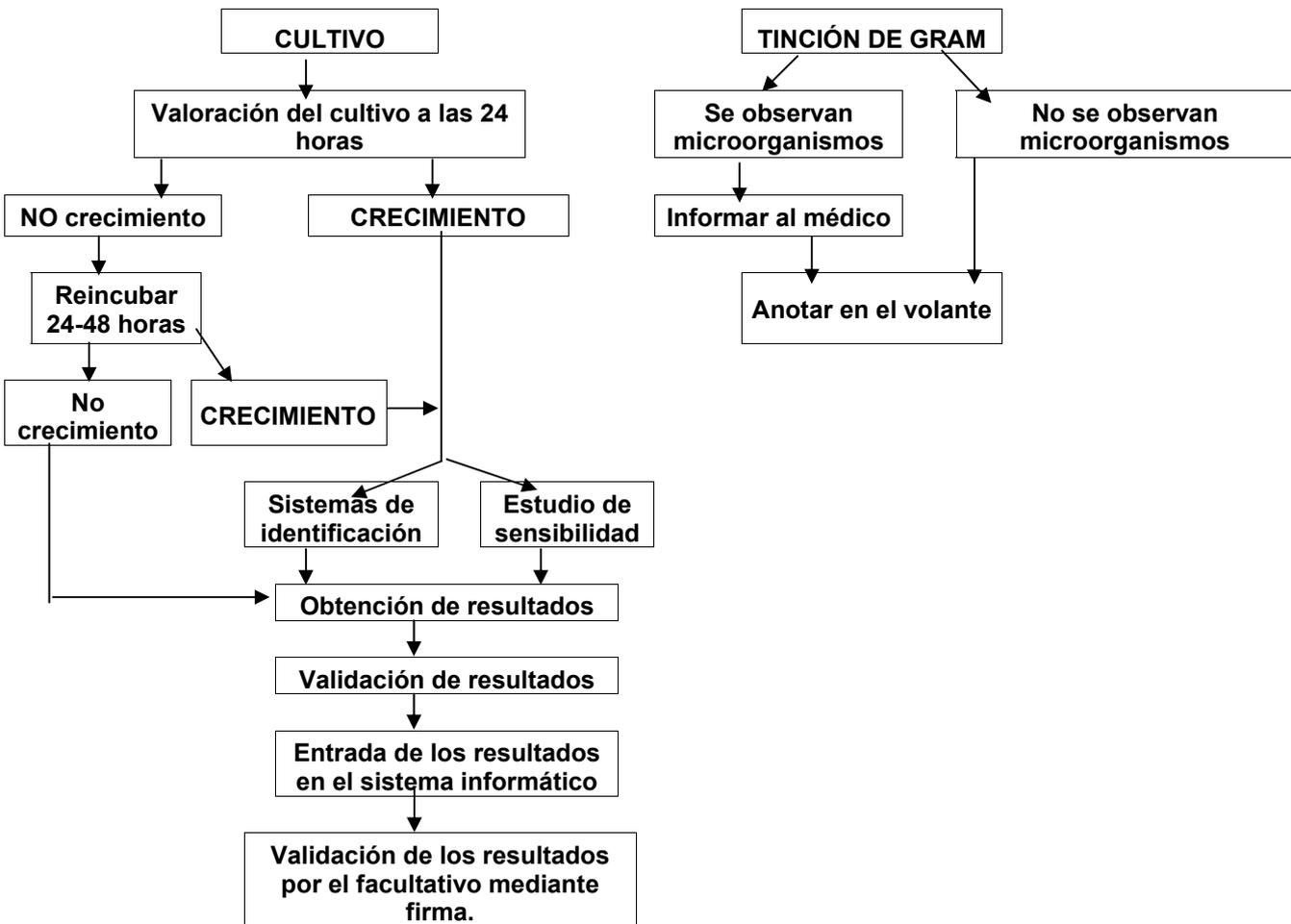
- Examinar los cultivos a las 24 h, 48 h y 72 h.
- Incubar los cultivos de las muestras en las que se sospechan microorganismos fastidiosos al menos 5 días (nocardia, criptococo....)
- **Informar preliminarmente** de aquellos resultados que puedan tener una relevancia clínica sobre todo en relación al tratamiento empírico.

Observación de las placas y caldo de enriquecimiento a las 24 horas
--

- A **las 24 horas de incubación**: examinar los medios sólidos y el BHI para ver si existe crecimiento.
 - ⇒ Si no se observa crecimiento: reincubar los medios sólidos y resembrar el BHI en agar sangre y chocolate. Se incuban durante 24- 48 horas más.
 - ⇒ Si se observa crecimiento en alguno de los medios:
 - Morfología típica de un microorganismo determinado: realizar protocolos específicos. (Anexo III)
 - Morfología inespecífica: Tinción de Gram. Continuar con los protocolos de identificación.(Anexo III)
- Si el cultivo es estéril a las 72 horas: se informa como NEGATIVO. Si se observa crecimiento se procesa como anteriormente se ha indicado.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 13 de 26

ORGANIGRAMA DEL PROCESAMIENTO DEL L.C.R.



2.7. Identificación de los aislamientos (Anexo III)

- La identificación de los microorganismos se realiza siguiendo las pautas descritas en los algoritmos del anexo

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 14 de 26

2.8. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana si procede.

- Las pruebas de sensibilidad se realizan con métodos de dilución en caldo (Sensititre *Haemophilus/Streptococcus*). Si es necesario se recurrirá al método de difusión en agar, siguiendo las normas de los NCCLS, 2004, o bien a la determinación de CIMs mediante E-test. Para la sensibilidad de los microorganismos que requieren menos condicionamientos nutricionales (*S. aureus*, enterobacterias,....) se realizará mediante el método automático MICROSCAN.

2.9. Estudios especiales.

a) Estudio de micobacterias

- El procesamiento de la muestra L.C.R. para el cultivo de micobacterias se recoge en el protocolo realizado para el diagnóstico de las infecciones por micobacterias.
- Si se solicita P.C.R. la muestra será enviada al Instituto Valenciano de Microbiología (IVAM). Se separará una alícuota de 1 ml (mínimo) que se mantendrá en nevera hasta su envío. La muestra irá acompañada por:
 - Informe del Laboratorio de Microbiología: datos de paciente, determinación solicitada y dirección.
 - Informe clínico del médico solicitante.

b) Estudio de parásitos

- El estudio de parásitos en L.C.R. se realiza en el CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA, (Instituto de Salud Carlos III), por lo que la muestra es enviada a dicho centro según procedimiento (P), adjuntando un protocolo suministrado por el mismo centro. Para ello, se debe separar una alícuota SIN CENTRIFUGAR y enviar al Laboratorio de Parasitología para la investigación de amebas.

c) Estudio de encefalopatías espongiiformes transmisibles

- La determinación de la proteína 14-3-3 en L.C.R. y estudio genético de mutaciones y polimorfismo será realizado en el CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGÍA, (Instituto de Salud Carlos III), por lo que la muestra es enviada a dicho centro según procedimiento (P), adjuntando un resumen de la historia clínica del paciente. Se enviará una alícuota de 1 ml (mínimo) conservado a temperatura ambiente.

d) Estudio de virus

- El cultivo y aislamiento de virus así como las técnicas de P.C.R. para detección de partículas virales en L.C.R. se realizarán en el laboratorio de Virología del Centro Nacional de Microbiología. Una vez recibida la muestra se separará 1 ml (mínimo) de muestra en tubo estéril que se mantendrá en nevera hasta su envío.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 15 de 26

- Se debe adjuntar un protocolo debidamente cumplimentado, el cual proporciona el mismo centro de referencia.

VIII. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Tanto las pruebas y resultados preliminares como los definitivos quedaran registrados en las hojas de trabajo del personal técnico. No obstante, sólo los resultados definitivos serán expresados en el informe, así como aquellos comentarios que el facultativo considere adecuados.

Informe definitivo:

- **NEGATIVO:** Si el cultivo es **estéril** a las 72 h horas de incubación.
- **FLORA DE CONTAMINACIÓN CUTÁNEA:** si tras la incubación, la identificación y valoración microbiológica, bioquímica y clínica el/los microorganismos aislados pertenecen a la flora de colonización de la piel.
- **POSITIVO, MICROORGANISMO y SENSIBILIDAD:** en el informe se indicará la identificación definitiva y la sensibilidad del microorganismo. El informe, antes de ser enviado al servicio peticionario, ha de ser revisado y validado por el facultativo responsable de la sección.

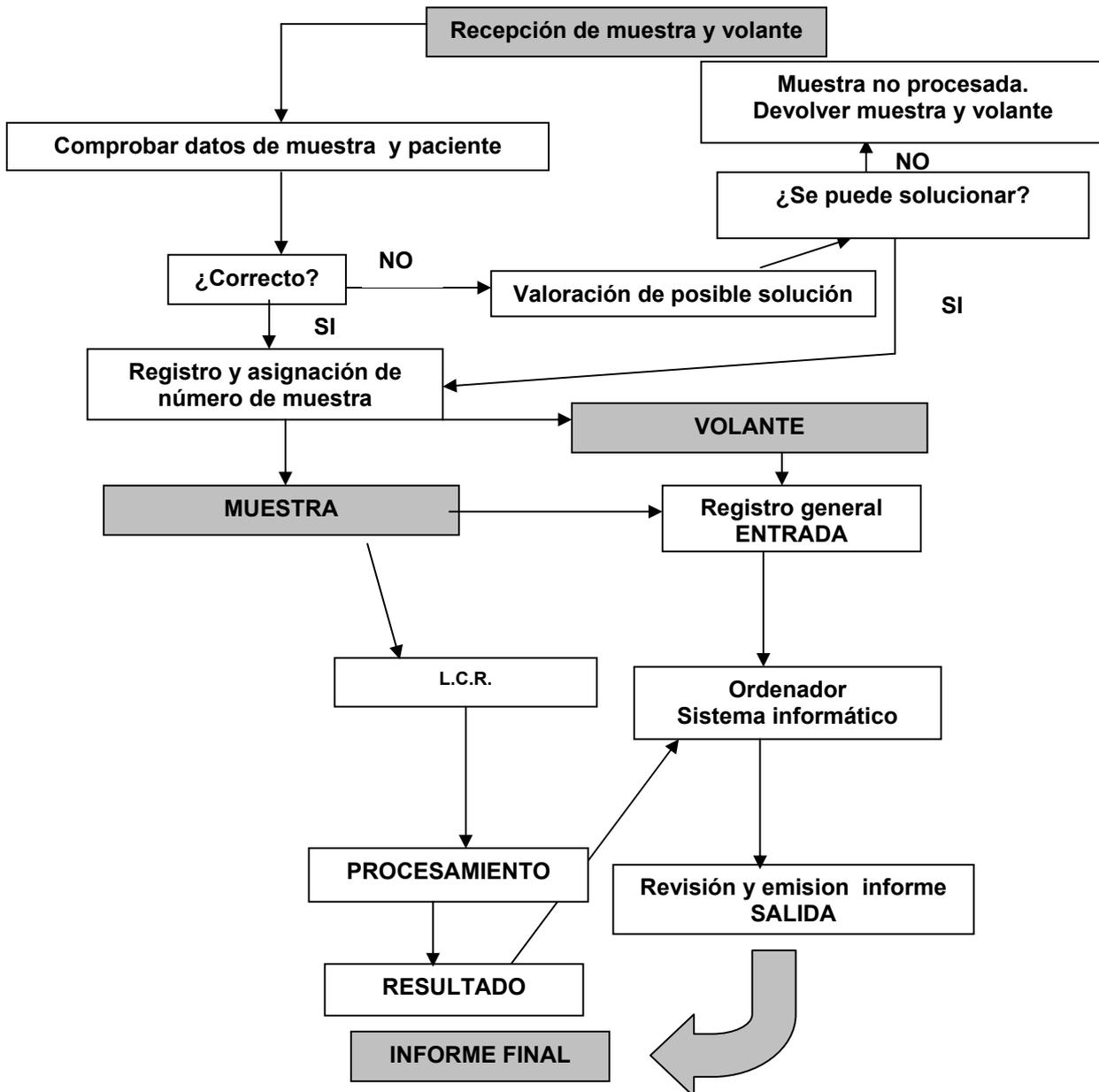
IX. RESPONSABILIDADES

- De la recogida de la muestra: Servicio peticionario
- De la siembra de la muestra: auxiliares clínicos y del facultativo responsable de la sección.
- De la lectura y el procesamiento de la muestra: técnico de laboratorio o D.U.E. y del facultativo responsable de la sección.
- De la interpretación de los resultados y del informe de los mismos: facultativo responsable de la sección.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 17 de 26

ANEXO I

GESTION DE LA INFORMACIÓN EN EL PROCESAMIENTO DEL L.C.R.



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 18 de 26

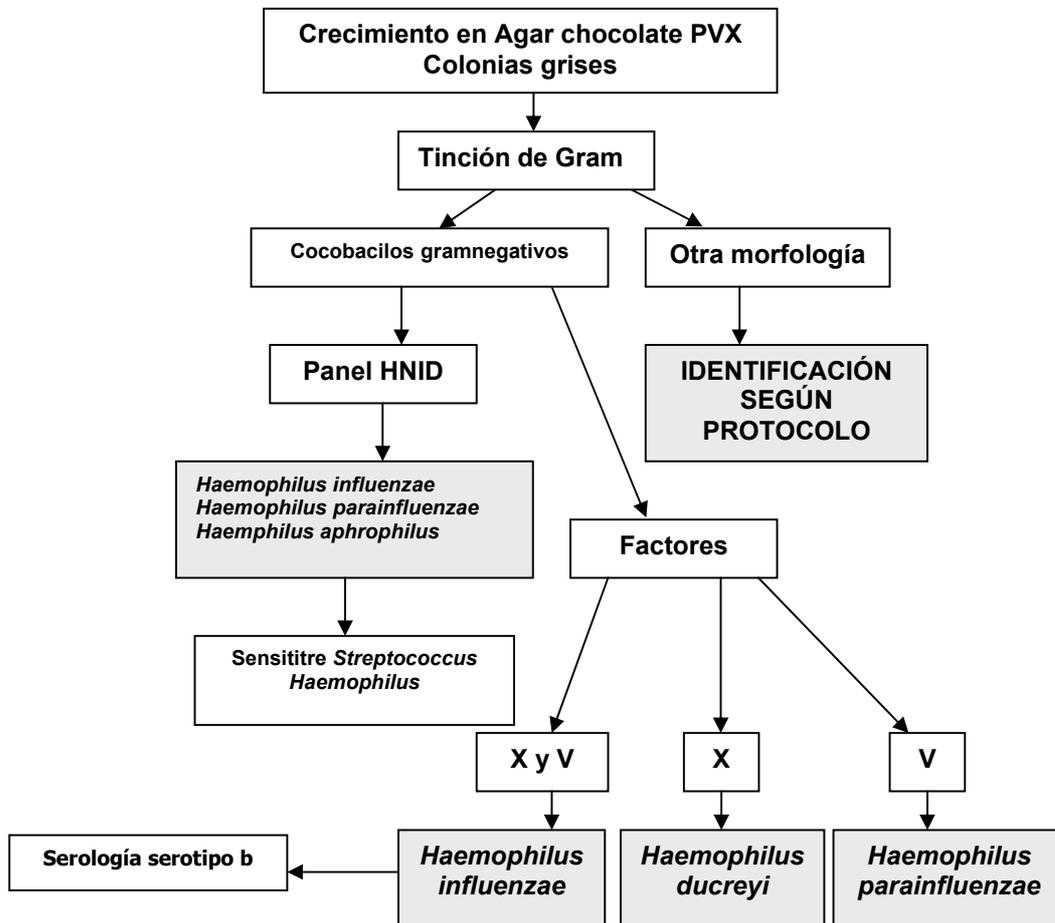
ANEXO II
PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS INFECCIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

MENINGITIS AGUDA		
EDAD	FRECUENTES	MENOS FRECUENTES
<3 meses	<i>E. coli</i> , <i>S. agalactiae</i>	<i>Otras enterobacterias</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Enterococcus</i> , VHS
1 mes-10 años	<i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , Enterovirus	<i>M. tuberculosis</i> , herpesvirus
10-60 años	<i>S. pneumoniae</i> , <i>N. meningitidis</i> , virus	<i>Brucella</i> , espiroquetas, <i>M. tuberculosis</i>
>60 ó inmunodepresión	<i>S. pneumoniae</i> , enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i> , <i>L. monocytogenes</i>	<i>N. meningitidis</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>
Fact. predisponentes	FRECUENTES	MENOS FRECUENTES
Herida craneal o espinal	<i>S. aureus</i> , enterobacterias, <i>P. aeruginosa</i>	Estafilococo coagulasa negativo, BGN no fermentadores
Fístula de L.C.R.	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pyogenes</i>
Derivación de L.C.R., catéter epidural	Estafilococo coagulasa negativo, <i>P. acnes</i>	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , enterobacterias.
MENINGITIS CRÓNICA		
Bacterias	<i>M. tuberculosis</i> , <i>Brucella</i> , <i>B. burgdoferi</i>	Micobacterias atípicas, <i>Nocardia</i> , <i>Actinomyces</i> spp.
Hongos	<i>Cryptococcus</i> spp., <i>Histoplasma</i> spp., <i>Coccidioides</i>	<i>Blastomyces</i> , <i>Candida</i>
Virus y parásitos	VIH	CMV , <i>Toxoplasma</i> , <i>Taenia solium</i>

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 19 de 26

ANEXO III
PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

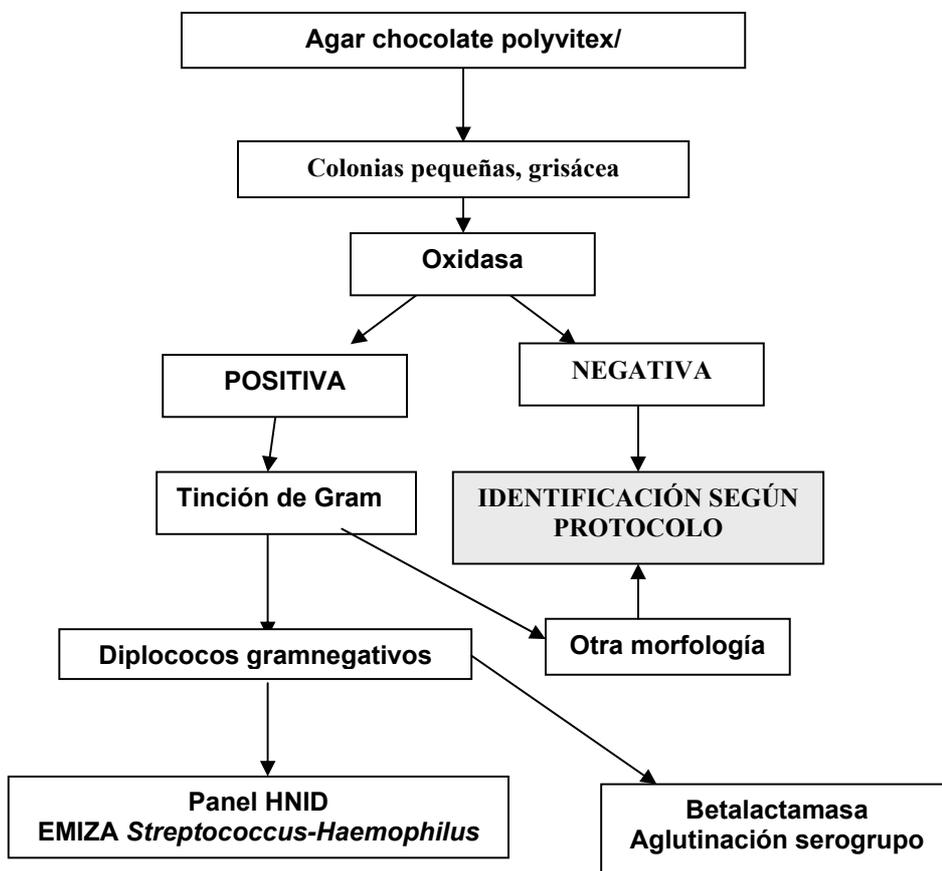
1. IDENTIFICACIÓN DE *Haemophilus influenzae*



	Catalasa	Oxidasa	Factor X	Factor V	IDX	Glucosa	Sucrosa
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	-	+			+	+	+

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 20 de 26

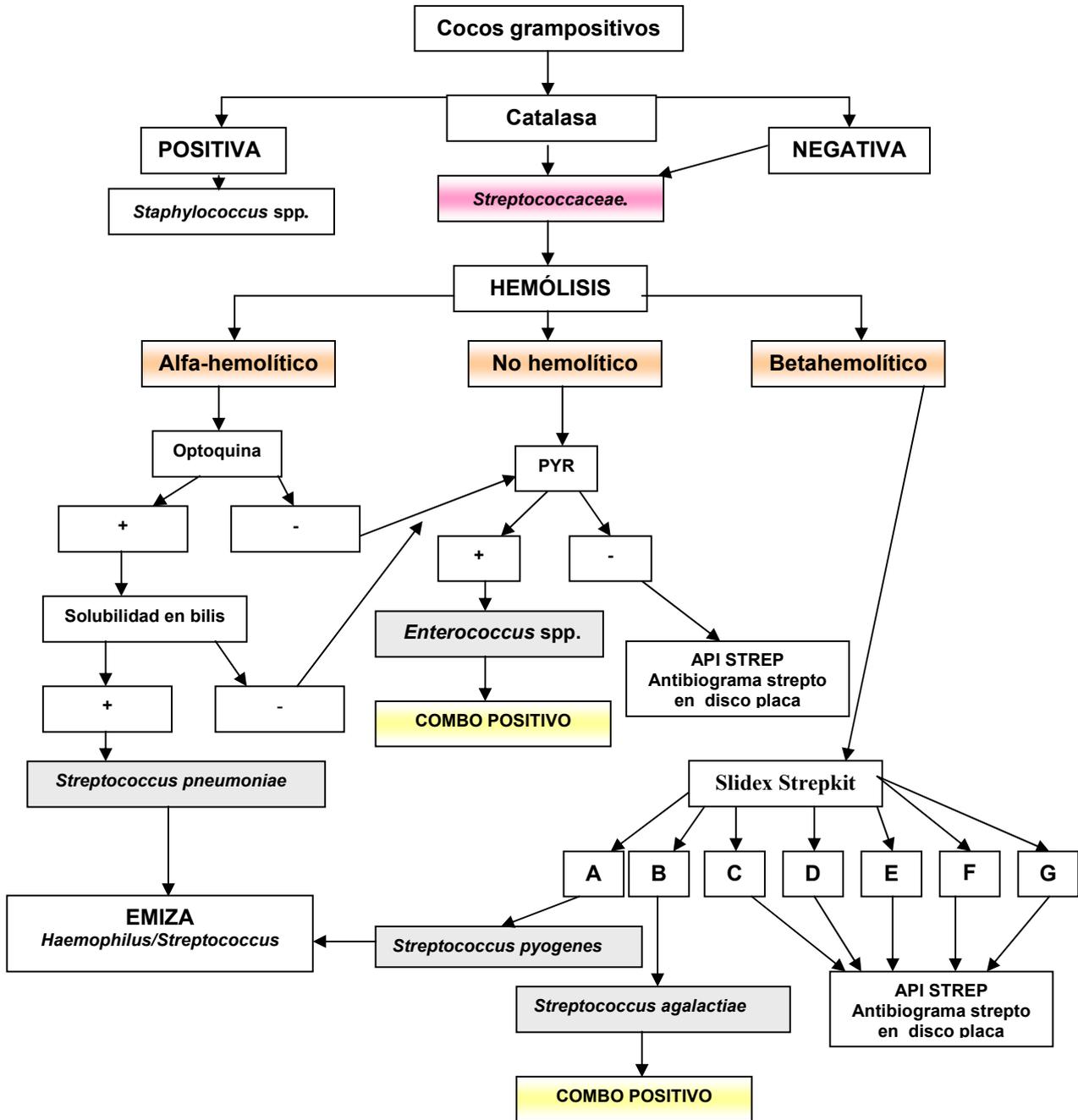
2. IDENTIFICACIÓN DE *Neisseria meningitidis*



	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. lactamica</i>
Glucosa	+	+	+
Maltosa	-	+	-
Lactosa	-	-	+
Resto de azúcares	-	-	-

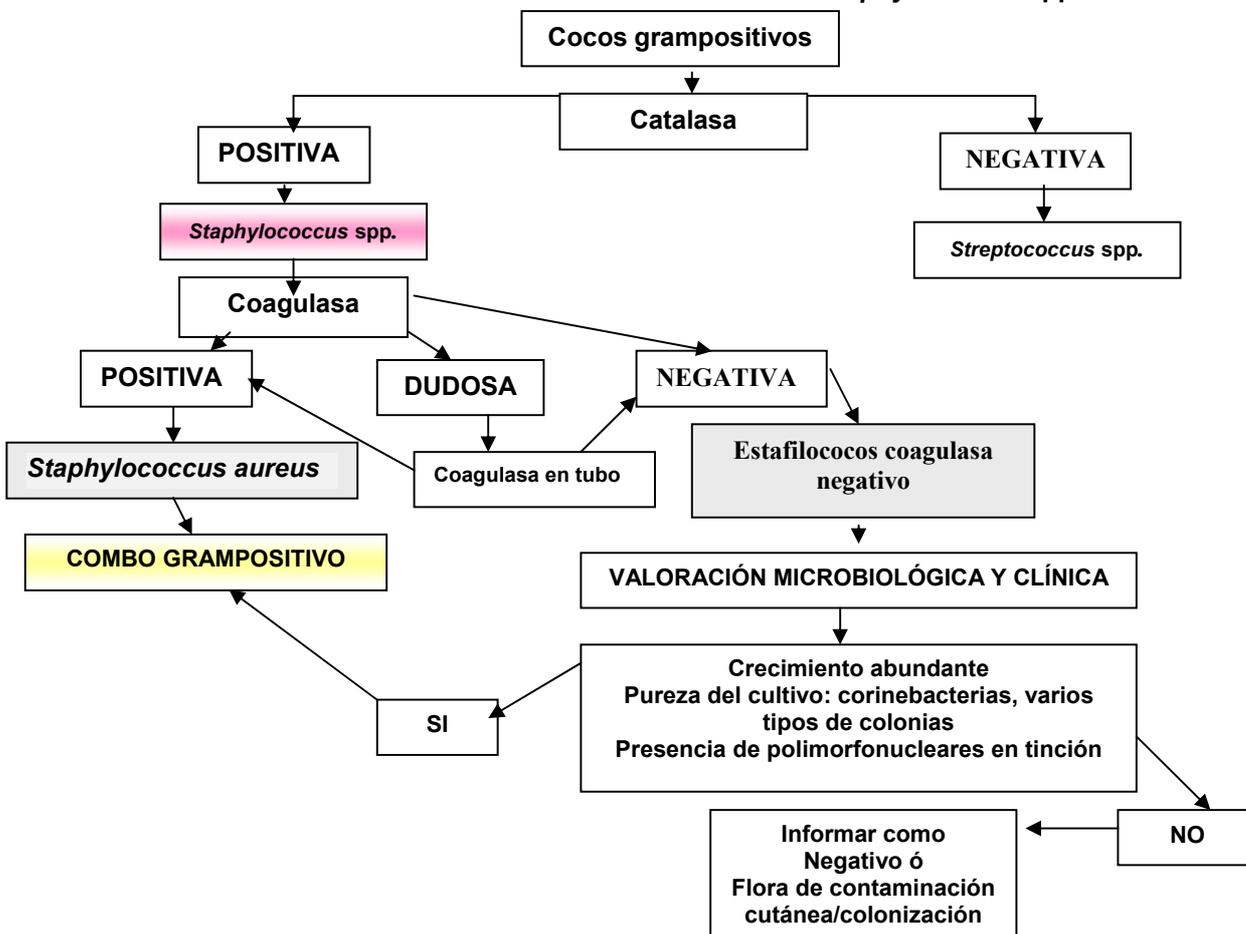
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 21 de 26

3. IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus pneumoniae*/*S. agalactiae*/OTROS ESTREPTOCOCOS



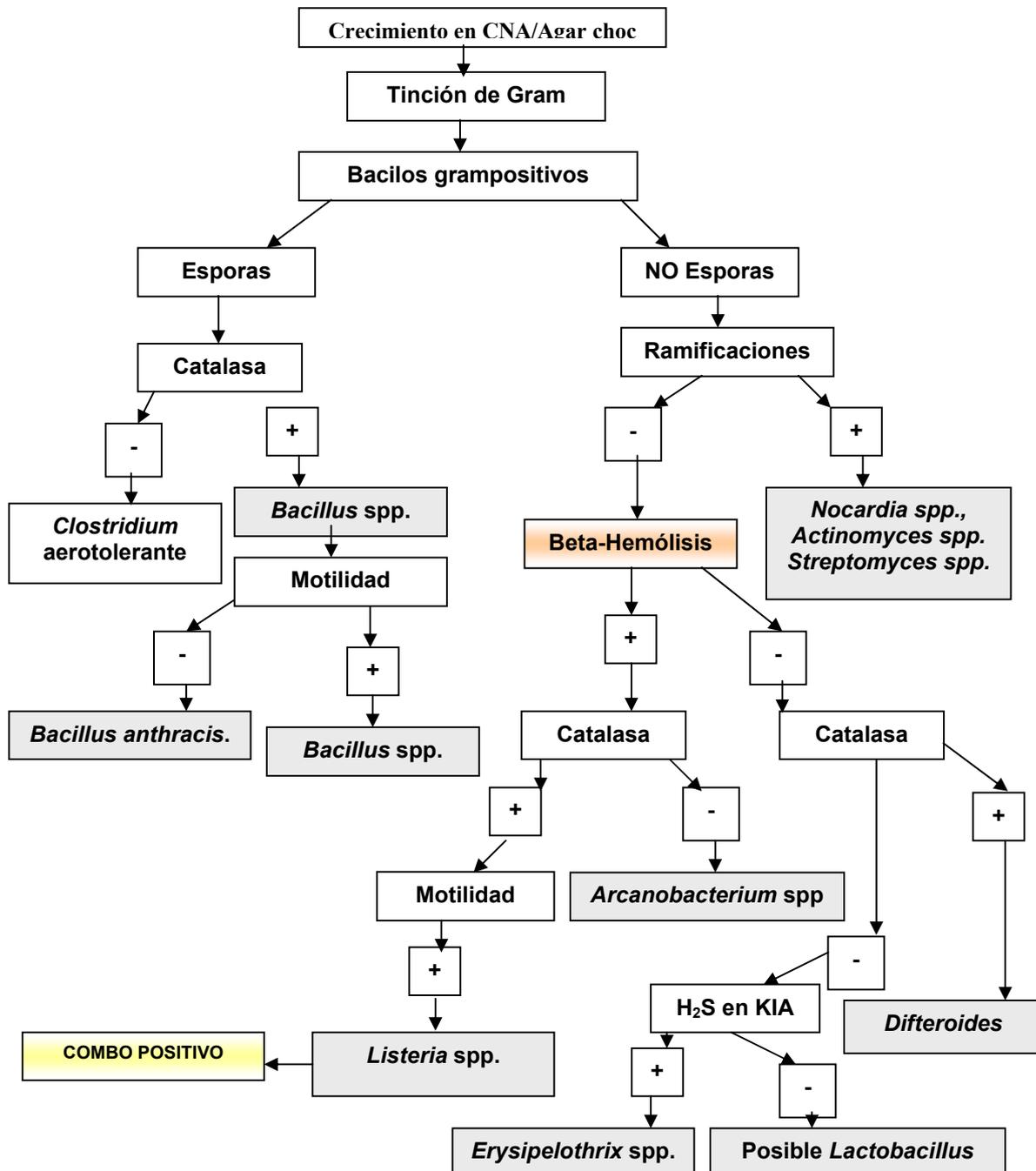
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 22 de 26

4. IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAMPOSITIVOS AEROBIOS: *Staphylococcus* spp.



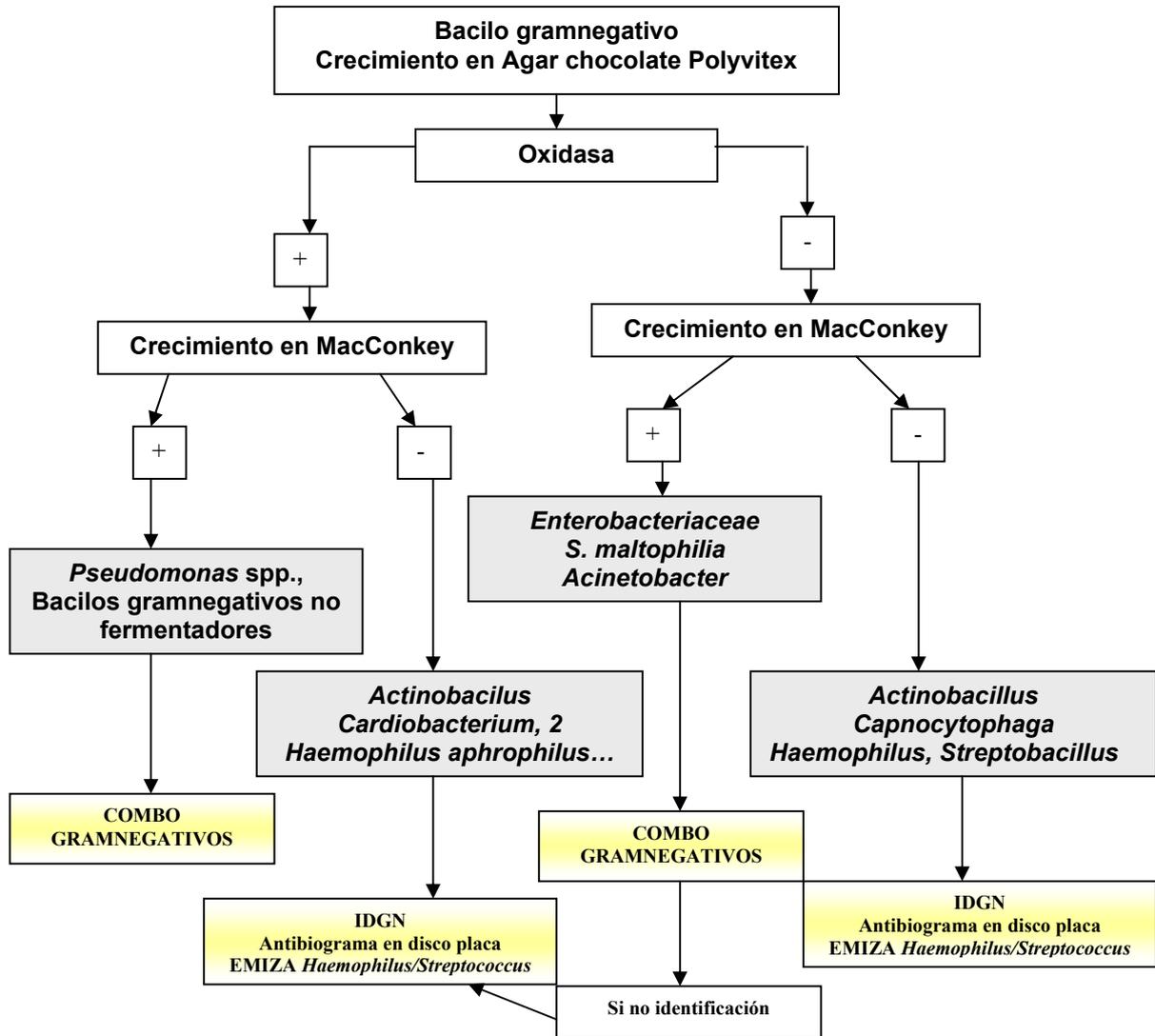
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 23 de 26

5. IDENTIFICACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*/OTROS BACILOS GRAMPOSITIVOS



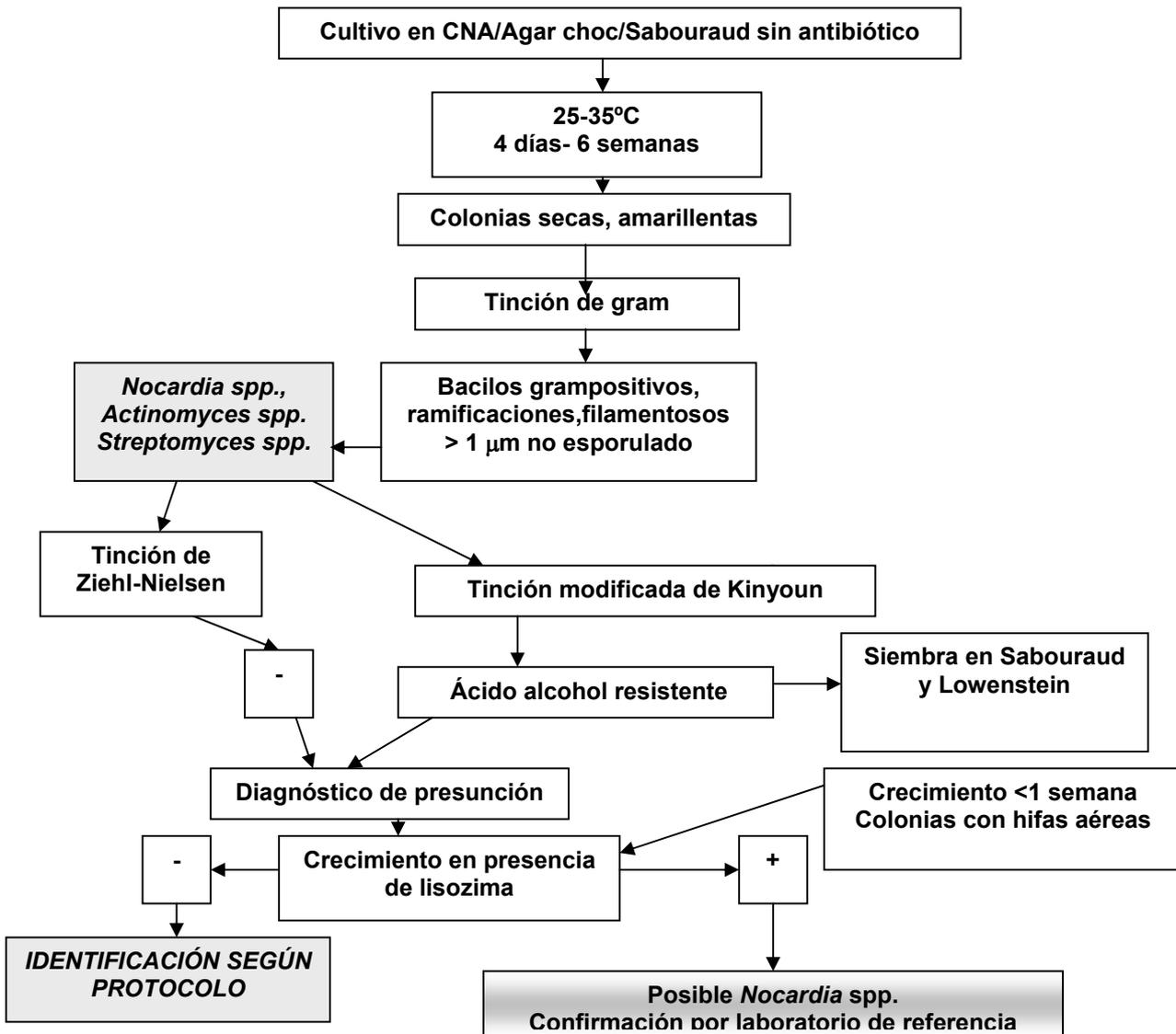
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 24 de 26

6. IDENTIFICACIÓN DE BACILOS GRAMNEGATIVOS AEROBIOS



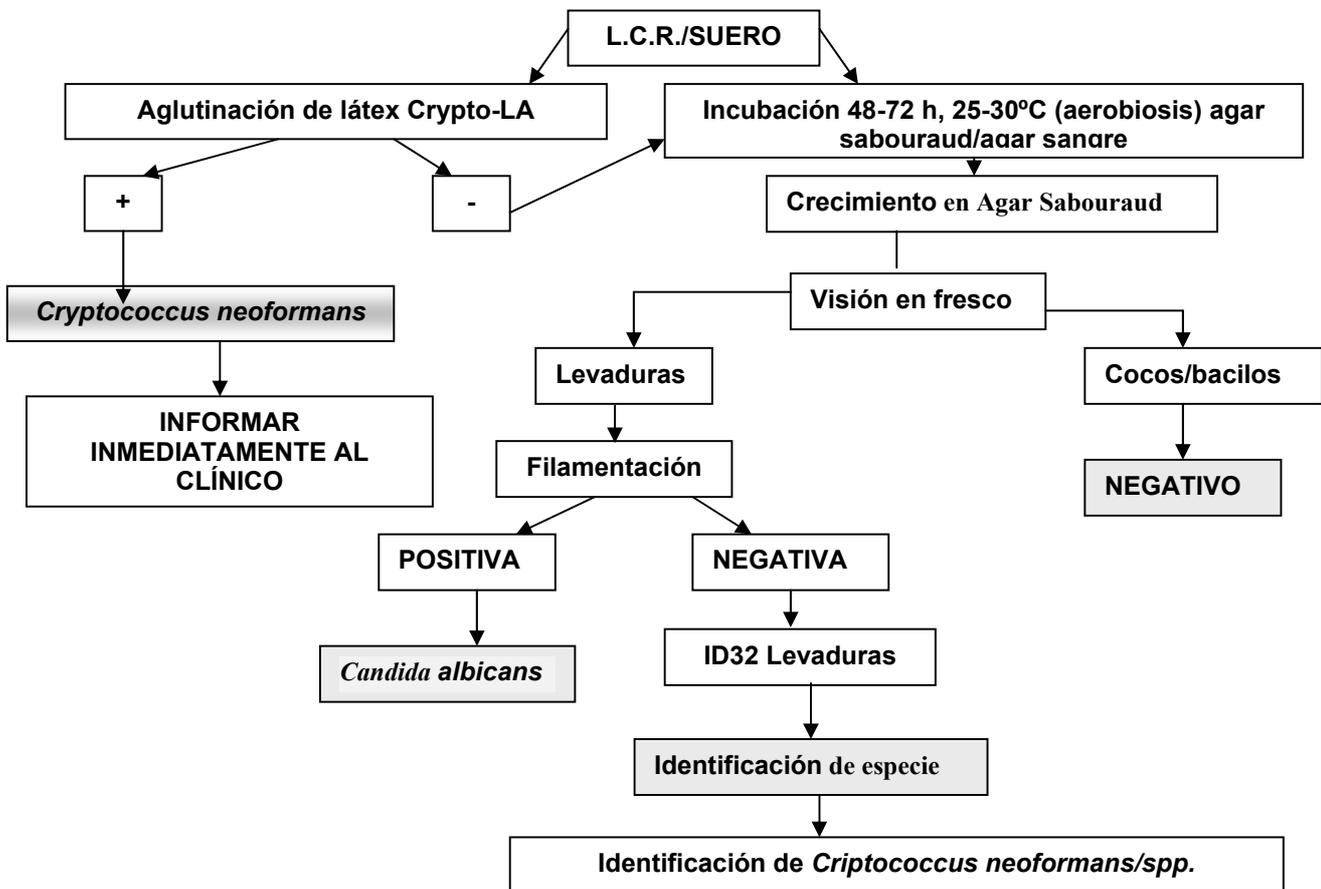
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 25 de 26

7. IDENTIFICACIÓN DE *Nocardia* spp.



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo	
	Edición: 01	Páginas: 26 de 26

8. IDENTIFICACIÓN DE *Cryptococcus* SPP./*Candida* SPP.



**DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS
PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE TRABAJO**

**UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA
HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA. ZAMORA**

Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos

INDICE

	PÁGINA
PROPÓSITO Y ALCANCE	3
FUNDAMENTO	3
DOCUMENTOS DE CONSULTA	4
RECEPCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS	5
EQUIPO Y MATERIALES	7
MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS	8
PROCEDIMIENTO HABITUAL	10
OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DEL RESULTADO	16
RESPONSABILIDADES	16
LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	17
BIBLIOGRAFIA	17
ANEXO I: Gestión de la información en el laboratorio de la sección de exudados	18
ANEXO II: Principales agentes etiológicos de las infecciones de piel y tejidos blandos	19
ANEXO III: Protocolo de identificación microbiológica de los patógenos	21

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 3 de 33

I. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo de este documento es normalizar el procesamiento de las muestras biológicas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos a través del estudio macroscópico, microscópico y microbiológico, así como la gestión y el registro de todos los datos que se deriven de dicho procesamiento. Su aplicación se extiende desde la obtención de la muestra hasta la identificación definitiva de los aislados.

II. FUNDAMENTO

La piel constituye la barrera principal del organismo y sus infecciones suponen un apartado importante en la patología infecciosa junto con las infecciones urinarias y respiratorias. Bajo el epígrafe de "**Infecciones de piel y tejidos blandos**" se engloban todas aquellas infecciones que afectan a piel, anejos cutáneos, tejido celular subcutáneo, fascias y músculo esquelético. Estas infecciones son muy frecuentes tanto en Atención Primaria como Especializada. Afecta a pacientes de todas las edades y el espectro de gravedad oscila entre un acné y una mionecrosis por clostridios.

Por tanto, dado el gran número de entidades clínicas que pueden incluirse y con el fin de facilitar la realización de este protocolo diagnóstico, se resumen en los siguientes, empleando dicho protocolo para el diagnóstico etiológico de cualquier cuadro clínico de esta localización:

a) **PIODERMIAS PRIMARIAS**: Se localizan de forma inicial en la piel y pueden dar síntomas a distancia. Pueden ser superficiales (impétigo, foliculitis, abscesos subcutáneos, forúnculo, paroniquia, ectima/erisipela, acné, infección de mordedura de animal, celulitis) o profundas (mionecrosis, celulitis necrotizante, fascitis necrotizante, gangrena estreptocócica, gangrena de Fournier).

b) **PIODERMIAS SECUNDARIAS**: Las más frecuentes son las que aparecen sobre heridas traumáticas o quirúrgicas, úlcera crónica (varicosa, decúbito, diabética..), dermatitis eczematosas, eritrodermias, hidrosadenitis supurativa, intertrigo, quiste pilonidal y sebáceo, pioderma gangrenosa.

c) **INFECCIONES SISTÉMICAS CON COMPONENTE CUTÁNEO**: tuberculosis cutánea, lepra, lúes, micobacterias atípicas.

D) **MANIFESTACIONES CUTÁNEAS DE ENFERMEDADES SISTÉMICAS**.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 4 de 33

La FLORA CUTÁNEA está constituida fundamentalmente por saprofitos o microorganismos de poca virulencia, como *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium*, *Micrococcus* spp., en menor proporción *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., bacterias anaerobias como *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp. y *Propionibacterium* spp., y algunos hongos (*Candida* spp.). Una parte de la flora cutánea se conoce como flora residencial temporal, caracterizada por presentar cierta diversidad de microorganismos patógenos capaces de producir infecciones así como estados de portador sano.

Este protocolo recoge el esquema de procedimiento a realizar para el diagnóstico de infecciones causadas fundamentalmente por bacterias y levaduras, puesto que la infección producida por virus, parásitos o dermatofitos serán tratados en otros protocolos por su diferente manejo.

No obstante, dada la multitud de bacterias que pueden producir infección en piel y tejidos subyacentes, este protocolo intenta ser una guía general para llegar al diagnóstico etiológico de los microorganismos más frecuentemente implicados.(Anexo II)

III. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. Manual de recogida, transporte y conservación de muestras (P)
2. Manual de procesamiento de muestras
3. Manual de envío de muestras
4. Protocolos de identificación bacteriana
5. Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica (Procedimientos en Microbiología Clínica, SEIMC 2000)

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 5 de 33

IV. RECOGIDA DE MUESTRAS

Recipientes:

- **Portagerm:** frasco para transporte de muestras con base de agar (código almacén 410133)
- **Envase estéril de boca ancha** (código almacén 410226)
- **Hisopo con medio de transporte: (desaconsejable)** (código almacén 410229)

Recogida de muestra:

a) Úlceras y heridas superficiales:

- **Lavar cuidadosamente la superficie de la herida con una torunda o gasa estéril con solución salina estéril.**
- **Recoger el exudado por aspiración con aguja y jeringa. Si la muestra es escasa, instilar suero fisiológico estéril y aspirar.**
- **Expulsar de la jeringa el posible contenido gaseoso, tapando la aguja con una gasa estéril impregnada en alcohol.**
- **Cambiar la aguja por una estéril e inocular en *portagerm*, previa desinfección del tapón de goma.**
- **Las jeringas empleadas para la aspiración no deben ser empleadas para el transporte debido al riesgo de pinchazos, la posible expulsión del material aspirado y la posibilidad de no conseguir la anaerobiosis.**

b) Abscesos:

- **Desinfectar la piel con alcohol de 70° y posteriormente con povidona yodada, dejando secar un minuto.**
- **Realizar punción-aspiración con jeringa y aguja, e introducir la muestra en *portagerm*.**

c) Fístulas:

- **Desinfectar la piel con alcohol de 70° y posteriormente con povidona yodada, dejando secar un minuto.**
- **Aspirar el exudado con aguja y jeringa de la parte profunda de la fístula (NUNCA DEL ORIFICIO FISTULOSO).**
- **Depositarla en *portagerm*.**

d) Biopsias:

d.1) Muestras sólidas: **Las muestras se recogerán siguiendo normas rigurosas de asepsia. Se recomienda obtener una pieza de al menos 5-10 cm³, procurando incluir las zonas más afectadas, así como el borde activo de la lesión, si está bien delimitada. Se depositarán en *envase estéril de boca ancha* al que debe añadirse dos o tres gotas de solución salina o en *portagerm*.**

d.2) Muestras líquidas: **Recoger una cantidad mínima de 5-10 ml mediante aspiración con aguja y jeringa, siguiendo las normas de máxima asepsia. Depositar en *portagerm* o *tubo estéril*.**

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 6 de 33

En el caso en el que solamente sea posible obtener la muestra con hisopo, se utilizarán aquellos con medio de transporte.

Transporte y conservación:

- **Envío inmediato al Laboratorio de Microbiología. Las muestras deben estar correctamente identificadas, junto con el volante de petición, indicando datos personales del enfermo, servicio donde se encuentra ingresado, número de cama, facultativo que solicita el estudio, o centro de salud. Sería aconsejable otra información adicional: sospecha clínica, enfermedad de base, tratamiento antimicrobiano...**
- **Si no es posible el envío inmediato, conservar a temperatura ambiente, máximo 24 horas.**

Criterios de aceptación

El laboratorio de Microbiología determina, una vez recibida la muestra, si cumple los requisitos para ser procesada. Estos requisitos incluyen, entre otros:

- d) Correcta identificación de la muestra
- e) Tipo de muestra adecuada para la petición solicitada
- f) Condiciones adecuadas de transporte y conservación (Manual de recogida y transporte muestras del Laboratorio de Microbiología).

Criterios de rechazo

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Muestras incorrectamente identificadas - Muestras derramadas - Volante incompleto - Muestra enviada en envase o recipiente inadecuado (no estéril, contaminado a simple vista) - Muestra no conservada en las condiciones adecuadas - Muestra enviada en formol - Muestra insuficiente |
|--|

El Laboratorio de Microbiología dispone de un sistema para el registro de las incidencias en el que se recoge la muestra implicada, persona que la recibe, tipo de incidencia, persona en contacto del servicio solicitante, y si la muestra es o no procesada.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 7 de 33

V. EQUIPOS Y MATERIALES

Para el diagnóstico de las infecciones de piel y tejidos blandos son necesarios una serie de equipos básicos:

- Nevera para conservación de muestras que así lo requieran, en caso de retraso en el procesamiento, (Control diario de la temperatura) así como para la conservación de medios de cultivo y reactivos.
- Estufa de aerobiosis a 37°C para cultivo de algunos microorganismos o conservación de muestras que así lo requieran.
- Estufa de CO₂ (5-10%) a 37°C para cultivo de aquellos microorganismos microaerófilos/capnófilos. (control diario de microaerofilia y temperatura).
- Microscopio óptico con objetivos de 10x, 40x, 100 x y ocular 10x (limpieza después de su utilización).
- Jarras o bolsas de incubación de anaerobiosis para el diagnóstico de infecciones por microorganismos anaerobios tanto grampositivos como gramnegativos. (control de anaerobiosis diaria).
- Sistemas automáticos (MicroScan..) y semiautomáticos (API, ID32GN.....) para identificación de microorganismos y estudios de sensibilidad de antimicrobianos.
- Material fungible: asas desechables de inoculación, portaobjetos, cubreobjetos, pipetas Pasteur, papel de filtro, guantes...
- Pipetas automáticas de 10, 100 y 1000 µl.
- Sistema informático para el registro de muestras, recogida de datos del paciente, así como para la emisión del resultado, base de datos y un programa estadístico para estudios epidemiológicos posteriores y análisis de costes.
- Material (hisopos, medios de transporte, portagerm, frascos estériles....) que se proporcionan a los diferentes servicios médicos y equipos de Atención Primaria para la recogida y envío correcto de las muestras.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 8 de 33

VI. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

Los medios de cultivo necesarios para el diagnóstico de las infecciones de piel y tejidos blandos varían en relación con el tipo de muestra enviada y el agente etiológico implicado. En la siguiente tabla (tabla 1) se especifican los medios que se tienen disponibles para el diagnóstico.

Medio de cultivo	Distribuidor/referencia	Código Hospital	Conservación	Observaciones
Agar tripticasa-soja+ 5% sangre	BioMérieux/43001	412694-31CC	4°C	Crecimiento no selectivo
Columbia ANC+ 5% sangre	BioMérieux/43071	412696-31CC	4°C	Crecimiento de grampositivos
Chocolate+ Polivitalex	BioMérieux/ 43101	412698-31CC	4°C	Crecimiento no selectivo
Chocolate+ Polivitalex+ VCAT2*	BioMérieux/43241	412699-31CC	4°C	<i>N. gonorrhoeae/meningitidis</i>
MacConkey	BioMérieux/ 43141	412689-31CC	4°C	Bacilos gramnegativos
Mueller-Hinton 5% sangre	BioMérieux/ 43321	412878-31CC	4°C	Pruebas de sensibilidad
Mueller-Hinton 2	BioMérieux/ 43301	417473-31CC	4°C	Pruebas de sensibilidad
Mueller Hinton-Chocolate	BBL/43544035	412670-31CC	4°C	Pruebas de sensibilidad
Sabouraud Glucosa-Cloranfenicol	Soria Melgizo/ 51078	417040-31CC	4°C	Hongos levaduriformes y filamentosos
Schaedler vita K1+ 5% sangre carnero	BBL/ 4354042	412668-31CC	4°C	Bacterias anaerobias
Schaedler Kanamicina-Vancomicina	BBL/ 4354023	412669-31CC	4°C	Bacterias anaerobias gramnegativas
Agar MRSA	Becton Dickinson/254570	414947-31CC	4°C	Detección de resistencia a meticilina
Agar CLED	OXOID/PPO0301	412802-31CC	4°C	Empleado para el control de pureza en bacilos gramnegativos para identificación y sensibilidad
Caldo thioglicolato	Becton Dickinson/221798	414454-31CC	4°C	Medio de enriquecimiento

Tabla 1: Medios de cultivo necesarios para diagnóstico de infecciones de piel y tejidos blandos.

*VCAT: vancomicina, colistina, anfotericina B, trimetoprim

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 9 de 33

En la siguiente tabla (tabla 2) se especifican equipos comerciales empleados para el diagnóstico y para los estudios de sensibilidad.

Nombre comercial	Distribuidor/referencia	Código Hospital	Observaciones
Oxidase Test	Mast-Diagnostic/371021	414534-31CC	Identificación <i>Neisseria</i> / <i>Haemophilus</i> /BGN
PYR Test	Mast-Diagnostic/ET07	417321-31CC	Identificación de estreptococos
Disco cefinasa	BBL/31650	413955-31CC	Detección de la presencia de betalactamasa
API 20A	BioMérieux/2030	412936-31CC	Identificación de anaerobios
API Strep	BioMérieux/2060	412859-31CC	Identificación de <i>Streptococcus</i> spp.
API Coryne	BioMérieux/20900	412683-41CC	Identificación de <i>Corynebacterium</i> spp.
ID32 Stap Estafilococos	BioMérieux/32500	414308-31CC	Identificación de <i>Staphylococcus</i> spp.
ID32 Levaduras	BioMérieux/32200	414307-31CC	Identificación de hongos levaduriformes
ID32 GN	BioMérieux/32100	414306-31CC	Identificación de bacilos gramnegativos
Slidex pneumo kit	BioMérieux/5882-1	412864-31CC	Detección de antígeno neumocócico
Slidex Strepkit	BioMérieux/58810	412869-31CC	Detección de antígenos de estreptococos hemolíticos
Slidex Staph Plus	BioMérieux/73115	412872-31CC	Identificación de estafilococos coagulasa positivo
Coagulasa plasma EDTA	BBL/0803-46-5	413999-31CC	Identificación de estafilococos coagulasa positivo
Panel <i>Haemophilus-Neisseria</i> (HNID)	Dade Behring/B1012-10B	412850-31CC	Identificación <i>Haemophilus</i> spp./ <i>Neisseria</i> sp.
Screening MRSA	Denka Seken CO/K1096	4127443-31CC	Detección de gen <i>mecA</i> responsable de resistencia a metilina
Suero <i>Francisella tularensis</i>	Becton Dickinson /240939	417291-31CC	Identificación de <i>Francisella tularensis</i>
Lector Microscan autoSCAN4	Dade Behring		Identificación y sensibilidad BGN, cocos grampositivos, <i>Listeria monocytogenes</i>
Sensititre <i>Haemophilus/Neisseria/Strep</i>	Dade Behring/772EMIZA4	413988-31CC	Sensibilidad de <i>Haemophilus</i> spp / <i>Neisseria</i> spp./ <i>Streptococcus</i> spp.
COMBO Gramnegativos	Dade Behring/B-1016-80	413883-31CC	Identificación y sensibilidad de Gramnegativos
COMBO Grampositivos	Dade Behring/B-1016-71	413882-31CC	Identificación y sensibilidad de Grampositivos
ATB ANA	BioMerieux/14269	413963-31CC	Estudio de sensibilidad en anaerobios

Tabla 2: Kits comerciales empleados para el diagnóstico y estudio de sensibilidad de las infecciones piel y tejidos blandos

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 10 de 33

VII. PROCEDIMIENTO HABITUAL

El desarrollo del método va a depender del tipo de muestra recibida y por lo tanto de la localización anatómica de la infección.

El esquema general a desarrollar para cada tipo de muestra será el siguiente:

1. **FASE PREANALÍTICA:** Obtención de la muestra, conservación, transporte y manipulación hasta su llegada al laboratorio. **(P)**
2. **FASE ANALÍTICA:** Incluye la recepción, procesamiento y emisión de los resultados.
 - 2.1. Recepción de la muestra: común para todas las muestras (Anexo I)
 - 2.2. Preparación de la muestra
 - 2.3. Examen macroscópico y microscópico de la muestra (tinción de Gram, visión en fresco)
 - 2.4. Cultivo de la muestra
 - 2.5. Incubación: procesamientos especiales
 - 2.6. Examen de los cultivos, interpretación y aislamiento
 - 2.7. Identificación de los aislamientos (Anexo III)
 - 2.8. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana si procede.
3. **FASE POSTANALÍTICA:** Procedimientos para la emisión de los informes analítico-clínicos

En cada informe analítico emitido por la UM debe constar:

- Identificación del laboratorio.
- Nombre y apellidos del paciente. Número de historia clínica.
- Ubicación del paciente: Servicio y nº de habitación en ingresados. Centro de atención primaria en externos.
- Fecha de nacimiento del paciente.
- Identificación del médico solicitante de los análisis.
- Identificación del servicio (GFH).
- Tipo de muestra. Fecha de recepción en el laboratorio de la misma.
- Número de registro de la muestra asignado en el laboratorio.
- Técnica aplicada a la muestra.
- Resultados en las unidades o forma de expresión recomendado por la comunidad científica.

- Identificación del responsable de la validación final del informe: Nombre y firma.
- Fecha de emisión del informe analítico.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 11 de 33

2.1. Recepción de la muestra: común para todas las muestras (Anexo I)

2.2. Preparación de la muestra:

- Una vez registrada la muestra y asignado un número de laboratorio, se deben seguir los pasos posteriores.
- Todos los pasos posteriores en el procesamiento de la muestra deben realizarse en campana de flujo laminar.
- Observación macroscópica de la muestra para identificar la presencia de pus, sangre, etc.
- Atemperar los medios de cultivo.
- Rotular los medios con el número de muestra, fecha y tipo de muestra.

2.3. Cultivo de la muestra

- **Muestras en hisopo:** rotar el hisopo sobre un borde de cada una de los medios de cultivo y extender con un asa estéril para siembra en aislamiento. Una vez inoculadas las placas de agar Schaedler, colocar en ellas un disco de amoxicilina-clavulánico, metronidazol y gentamicina.
- **Muestras en portagerm:** tomar la muestra con un asa estéril y sembrar cada una de las placas en estría para aislamiento. Inocular el asa después de la siembra de cada placa. Una vez inoculadas las placas de agar Schaedler, colocar en ellas un disco de amoxicilina-clavulánico, metronidazol y gentamicina. El resto del material se pasa con pipeta estéril a caldo de enriquecimiento de thioglicolato.
- **Muestras de tejido/biopsias en envase estéril:** en una placa de Petri depositar el tejido y con un bisturí estéril, fragmentarlo y homogeneizar la muestra. Remover la muestra con una pipeta Pasteur estéril, incluso si es necesario añadiendo unas gotas de solución salina o agua para evitar su desecación. Inocular la muestra así homogeneizada en los diferentes medios con un asa estéril en estría para aislamiento. Inocular el asa después de la siembra en cada placa. Una vez inoculadas las placas de agar Schaedler, colocar en ellas un disco de amoxicilina-clavulánico, metronidazol y gentamicina. Como alternativa, añadir la muestra ya homogeneizada a un caldo de thioglicolato e incubarlo 24 horas para su posterior siembra en los medios correspondientes: usualmente agar chocolate y agar Schaedler vit K (5% sangre), e incubar 24 h más.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 12 de 33

- Para todos los tipos de muestra mencionados se siembran los siguientes medios:

Medio de cultivo	Temperatura incubación	Tiempo de incubación	Ambiente
Agar Chocolate polivitallex	35-37°C	24 h	5-10%CO ₂
Agar CNA + 5% sangre	35-37°C	24 h	5-10%CO ₂
Agar MacConkey	35-37°C	24 h	Aerobiosis
Agar Schaedler vit K + 5% de sangre	35-37°C	48 h	Anaerobiosis(3)
Agar Schaedler Kanamicina-vancomicina	35-37°C	48 h	Anaerobiosis(3)
Caldo thioglicolato (1)	35-37°C	24 h	Aerobiosis
Agar Sabouraud glucosa-cloranfenicol (2)	35-37°C	24 h	Aerobiosis

(3) Este medio de cultivo sólo se inoculará en caso de que la muestra sea enviada en portagerm

(4) La siembra en este medio se realizará previa petición expresa del doctor solicitante

(5) Incubación en jarras o bolsas de anaerobiosis conseguida mediante sobres de AnaeroGen™

2.4. Examen microscópico: Tinción de gram

- Una vez inoculados los medios de cultivo, se procederá a:
 - Rotar hisopo por portaobjetos y dejar secar.
 - Tinción de Gram (**P**)
- Se analizarán los siguientes datos:
 - Presencia o ausencia de leucocitos polimorfonucleares/ histiocitos/macrófagos para interpretar la significancia clínica de los microorganismos aislados
 - Presencia de células epiteliales, sugiriendo toma superficial
 - Presencia de flora mixta grampositiva-gramnegativa
 - Determinación de la necesidad de realizar más estudios o investigaciones especiales.

2.5. Incubación: procesamientos especiales

- Aunque la mayor parte de los microorganismos productores de infecciones de piel y tejidos blandos crecen en los medios indicados anteriormente y siguiendo el protocolo anterior, en ocasiones se solicitan la investigación de otros microorganismos que requieren condiciones específicas para su crecimiento:
 - a) *Francisella tularensis*: si existe una sospecha de tularemia, esto debe indicarse en el volante claramente. La muestra será procesada de la misma manera que una muestra a la que soliciten bacteriología general, pero se añadirá a la siembra una segunda placa de Agar chocolate, y una de Agar chocolate polyvitalex + VCAT. Las placas se sellan para evitar su apertura accidental. La

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 13 de 33

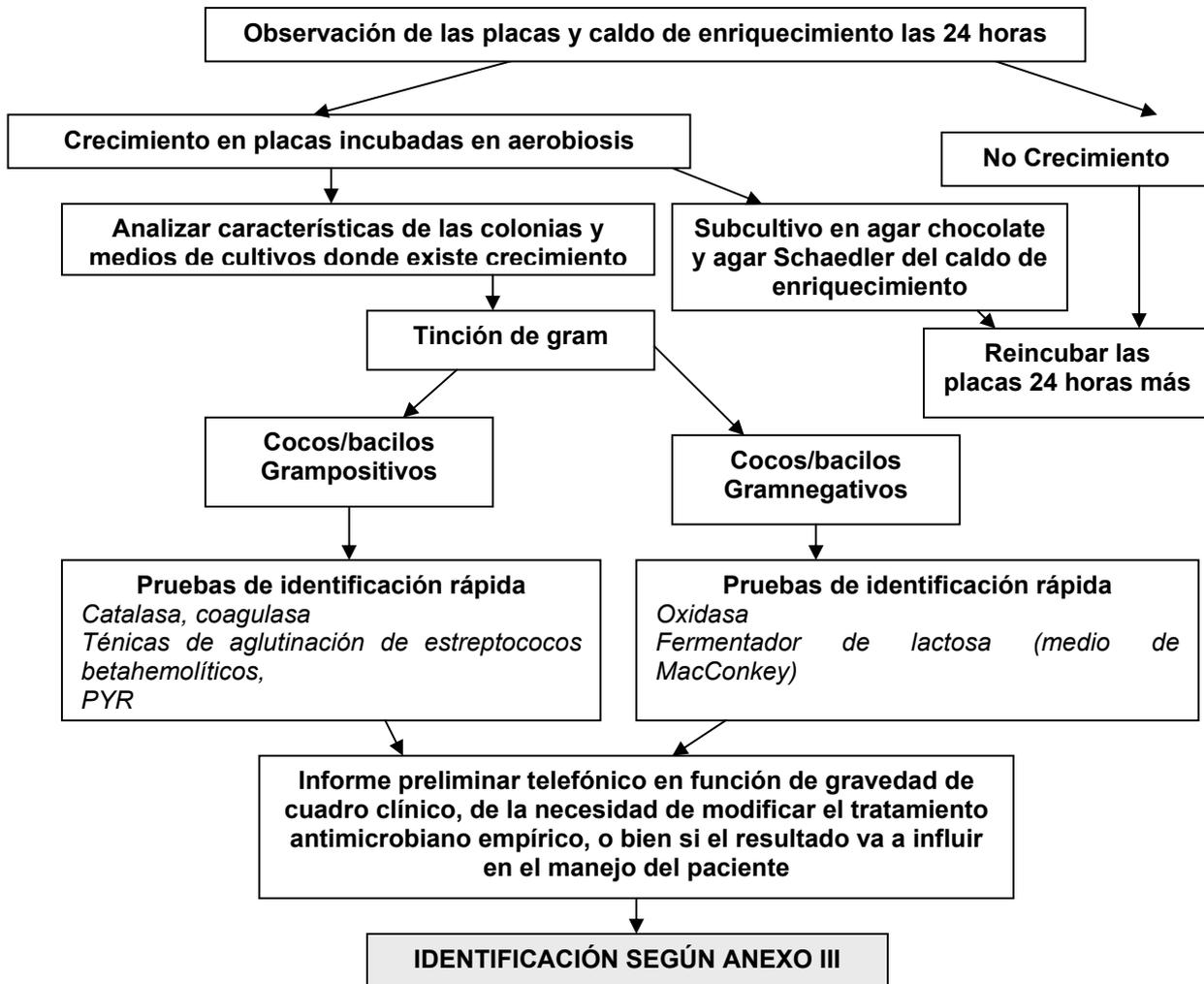
incubación de las dos placas de Agar chocolate en estufa de un 5-10%CO₂ se prolongará durante 5 días y se revisarán diariamente para observar la existencia de crecimiento.

- b) *Actinomyces spp.*: si existe una sospecha de actinomicosis, esto debe indicarse en el volante claramente, ya que requiere un pretratamiento especial y una incubación prolongada. La muestra será procesada de la misma manera que una muestra en la que soliciten bacteriología general. Además, la muestra debe ser inoculada en un caldo de thioglicolato e incubarse en anaerobiosis a 35-37°C un mínimo de 7 días, llegando incluso a dos semanas.

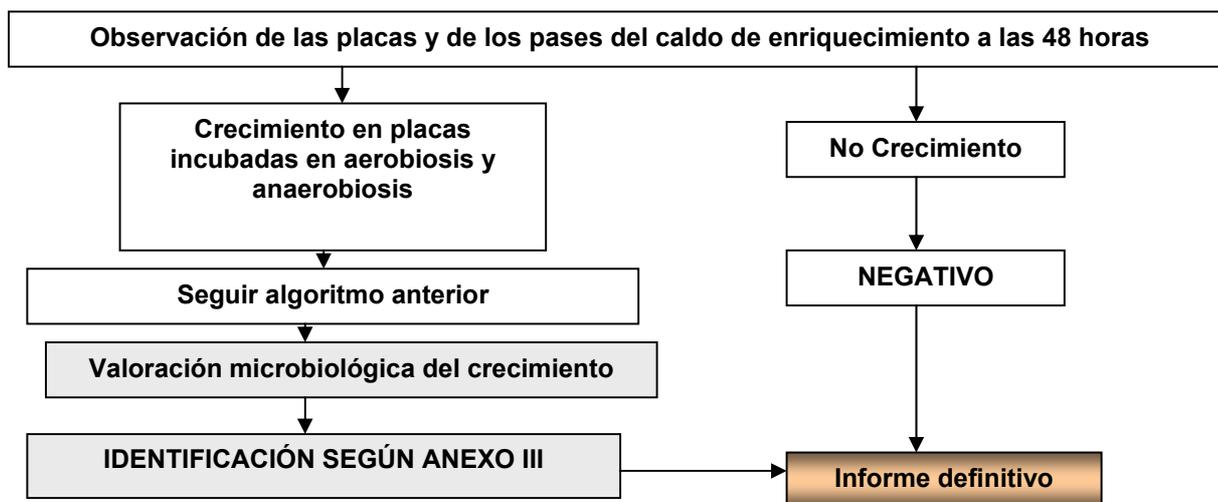
2.6. Examen de los cultivos, interpretación y aislamiento

- Examinar los cultivos a las 24 h y a las 48 h
- Incubar los cultivos de las muestras en las que se sospechan microorganismos fastidiosos al menos 5 días.
- **Informar preliminarmente** de aquellos resultados que puedan tener una relevancia clínica sobre todo en relación al tratamiento empírico.

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 14 de 33



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 15 de 33



Interpretación y lectura de las placas:

CRECIMIENTO	PROCEDIMIENTO
- Cualquier crecimiento de patógenos: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> . - Patógenos con impredecible patrón de sensibilidad - Todos los microorganismos aislados de muestras estériles	IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE SENSIBILIDAD
- Posible flora de colonización cutánea: estafilococos coagulasa negativa, corinebacterias, estreptococos grupo viridans, <i>Bacillus</i> spp. - <u>Excepción</u> : microorganismo con estas características pero aislado en cultivo puro abundante, observado en la tinción de gram y de una muestra bien recogida	IDENTIFICACIÓN
- Más de tres especies de flora intestinal, procedente de abscesos intrabdominales, úlceras de decúbito, drenajes intestinales, exudados del área pélvica, absceso perianal.. - <u>Excepción</u> : si alguno de los microorganismos es predominante o	NO IDENTIFICACIÓN NI ESTUDIO DE SENSIBILIDAD

bien si el facultativo una vez informado, así lo requiriera.	
--	--

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 16 de 33

2.7. Identificación de los aislamientos (Anexo III)

- La identificación de los microorganismos aerobios/anaerobios se realiza siguiendo las pautas descritas en los algoritmos del anexo III

2.8. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana si procede.

- Las pruebas de sensibilidad en la mayoría de las ocasiones están incluidas en el método automático de identificación bacteriana (AUTOSCAN), o bien se realizan con otros métodos de dilución en caldo (Sensititre *Haemophilus/Streptococcus*, ATB ANA). En ocasiones, si es necesario se recurrirá al método de difusión en agar, siguiendo las normas de los NCCLS, 2004, o bien a la determinación de CIMs mediante E-test

VIII. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Todas las pruebas y resultados preliminares así como los resultados definitivos quedan registrados en las hojas de trabajo del personal técnico. Únicamente los resultados definitivos se registran en el ordenador y son expresados en el informe, así como aquellos comentarios que el facultativo considere necesarios sobre la identificación sensibilidad a antimicrobianos, y recomendaciones.

Los resultados emitidos en el informe serán:

- NEGATIVO:** si tras la incubación de las placas durante los días pertinentes, no se ha constatado crecimiento.
- FLORA DE COLONIZACIÓN/FLORA MIXTA HABITUAL/FLORA DE CONTAMINACIÓN CUTÁNEA:** si los microorganismos aislados corresponden a la flora saprofita de la piel, varios microorganismos de la flora intestinal....
- MICROORGANISMO Y SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS:** el informe recogerá la identificación definitiva y la sensibilidad, así como los comentarios que sean necesarios

El informe, una vez emitido será revisado y validado por el facultativo responsable de la sección antes de ser enviado al servicio peticionario.

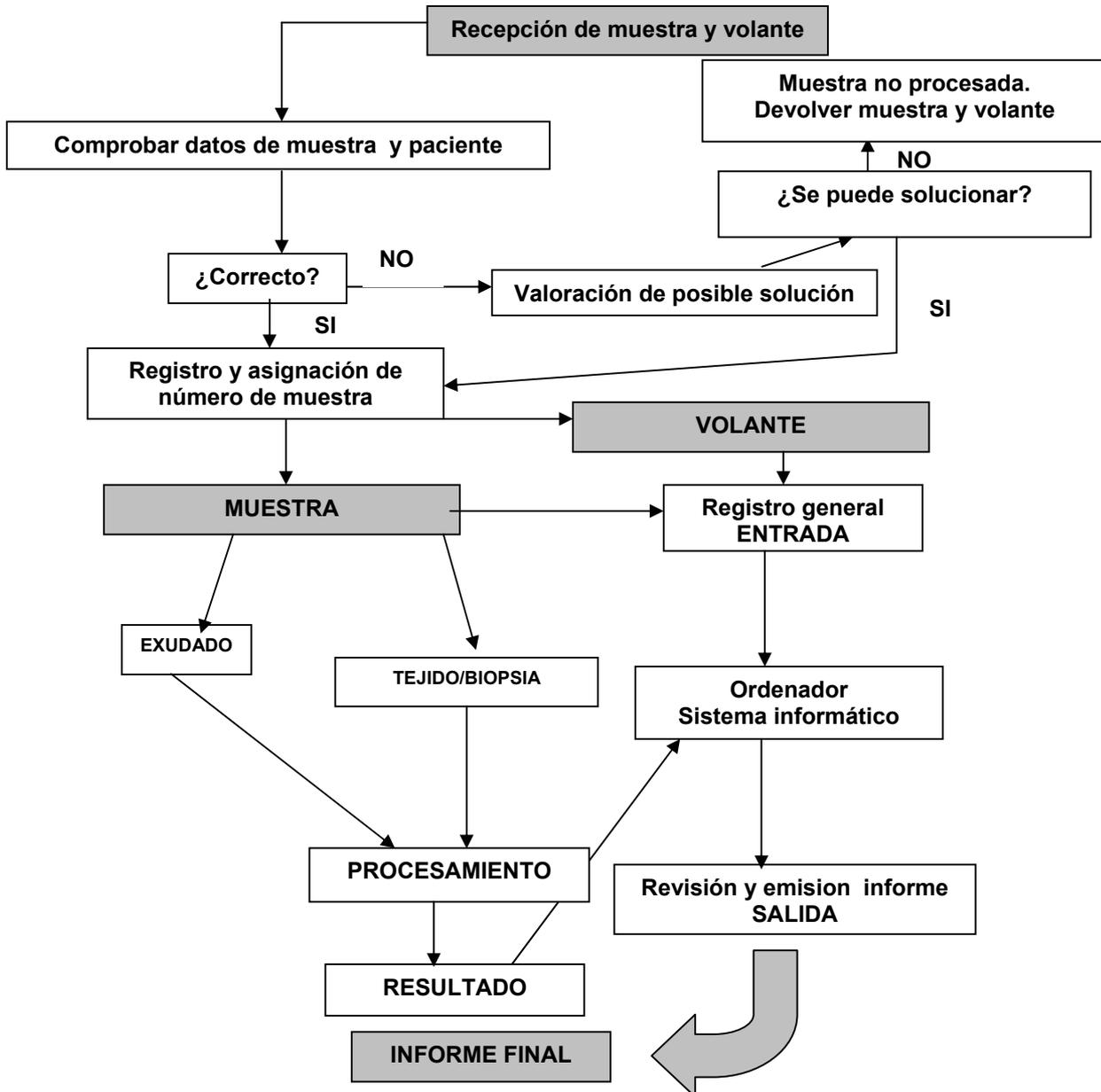
IX. RESPONSABILIDADES

- De la recogida de la muestra: Servicio peticionario

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 18 de 33

ANEXO I

GESTION DE LA INFORMACIÓN EN EL LABORATORIO DE LA SECCION DE EXUDADOS



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 19 de 33

ANEXO II.A
PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS

Entidad	Cuadro clínico		Patógenos frecuentes	Patógenos menos frecuentes
Piodermias primarias superficiales	Impétigo		<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	Foliculitis		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida albicans</i>
	Forúnculo		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Hidrosadenitis		<i>Staphylococcus aureus</i> /Flora anaerobia de faringe	Bacilos gramnegativos Estreptococos grupo "milleri"
	Paroniquia		<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> Flora de orofaringe	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Virus herpes simplex/Enterobacterias
	Onicomiosis		Dermatofitos/ <i>Candida</i> spp.	Otros hongos
	Abscesos subcutáneos		<i>Staphylococcus aureus</i> / Flora mixta aerobia-anaerobia	
	Erisipela		<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Estreptococos grupo C y G <i>Aeromonas hydrophila</i> , enterobacterias
Piodermias primarias profundas	Mionecrosis		Flora mixta aerobia-anaerobia <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	Celulitis y fascitis necrotizante		Flora mixta aerobia-anaerobia <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	Celulitis por mordedura	Animal	Flora mixta aerobia-anaerobia <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pasteurella multocida</i>	<i>Actinobacillus</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Capnocytophaga canimorsus</i> , <i>Erysipelothrix</i> spp.
		Humana	Flora mixta aerobia-anaerobia <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Eikenella corrodens</i>	<i>Actinomyces</i> spp., otros
	Gangrena gaseosa		<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacteroides</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp, <i>E. coli</i>

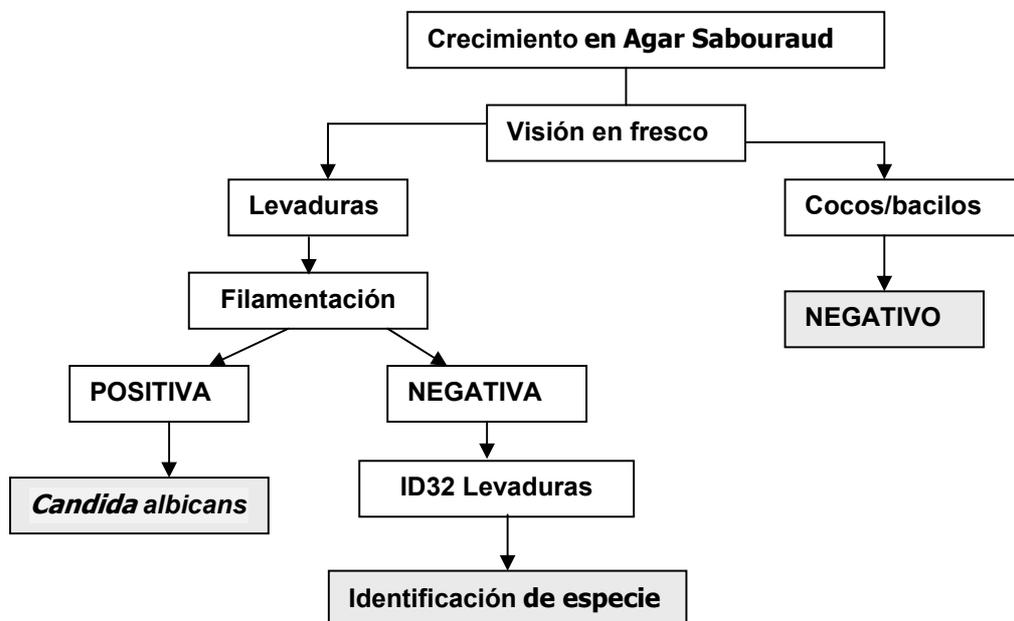
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 20 de 33

ANEXO II.B

PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS DE LAS INFECCIONES DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS

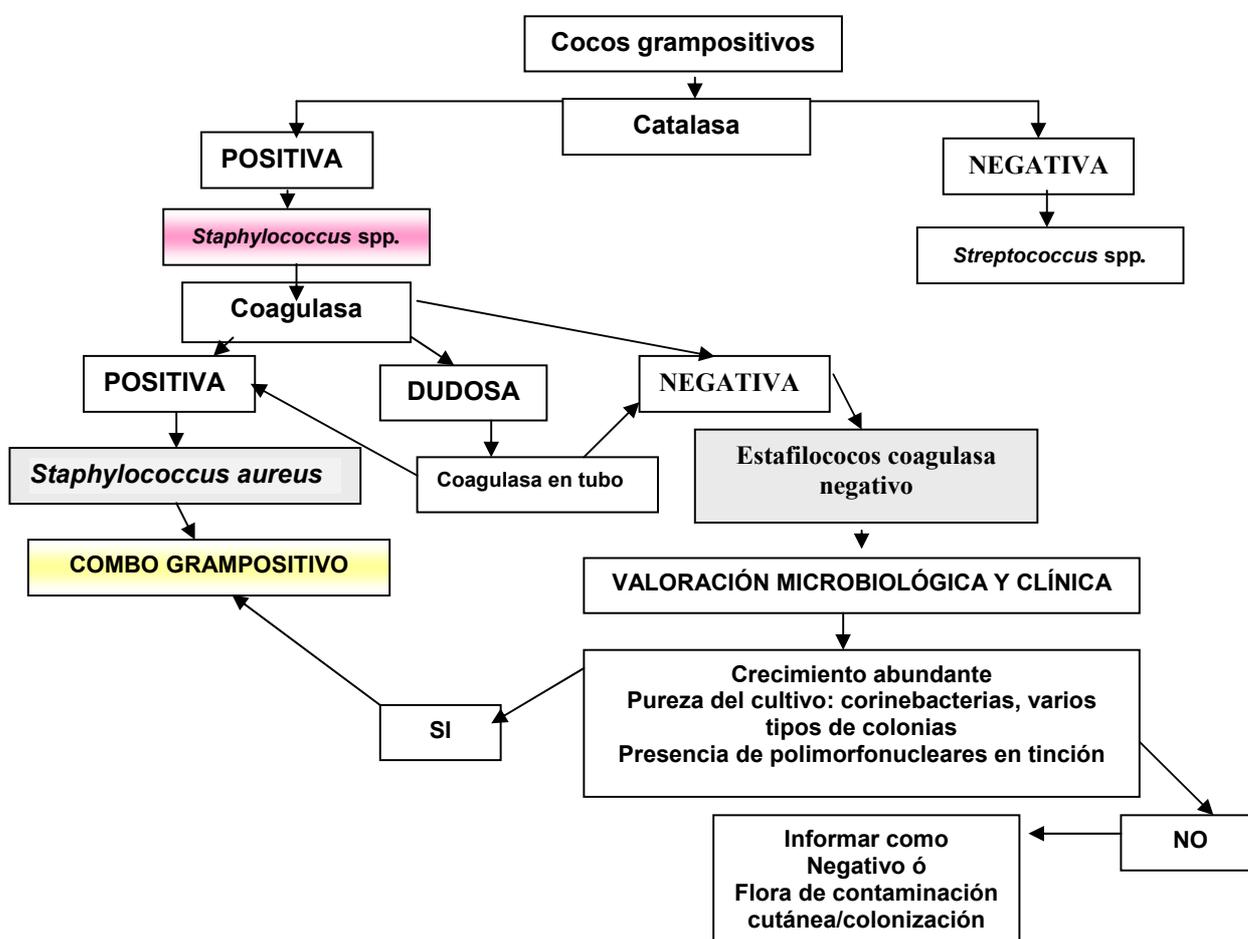
Entidad	Cuadro clínico	Patógenos frecuentes	Patógenos menos frecuentes
Piodermias secundarias	Herida traumática o quirúrgica	<i>Staphylococcus aureus</i> Flora mixta aerobia/anaerobia	-
	Dermatitis eczematosas/eritrodermias	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Enterobacterias	-
	Pioderma gangrenoso	<i>S. aureus</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Proteus</i> y otros coliformes	-
	Úlcera crónica (varicosa, decúbito, diabética..)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> Otros estreptococos Flora mixta aerobia/anaerobia	-
	Intértrigo	<i>Candida spp</i> Dermatofitos	<i>Corynebacterium minutisimum</i>
Infecciones sistémicas con componente cutáneo	Tuberculosis cutánea, Sífilis, Lepra		
Manifestaciones cutáneas de enfermedades sistémicas	Bacteriemias, endocarditis, síndrome de la piel escaldada, leptospirosis, listeriosis, meloidosis, púrpura por neiserias..		

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 21 de 33

ANEXO III**PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS****1. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS**

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 22 de 33

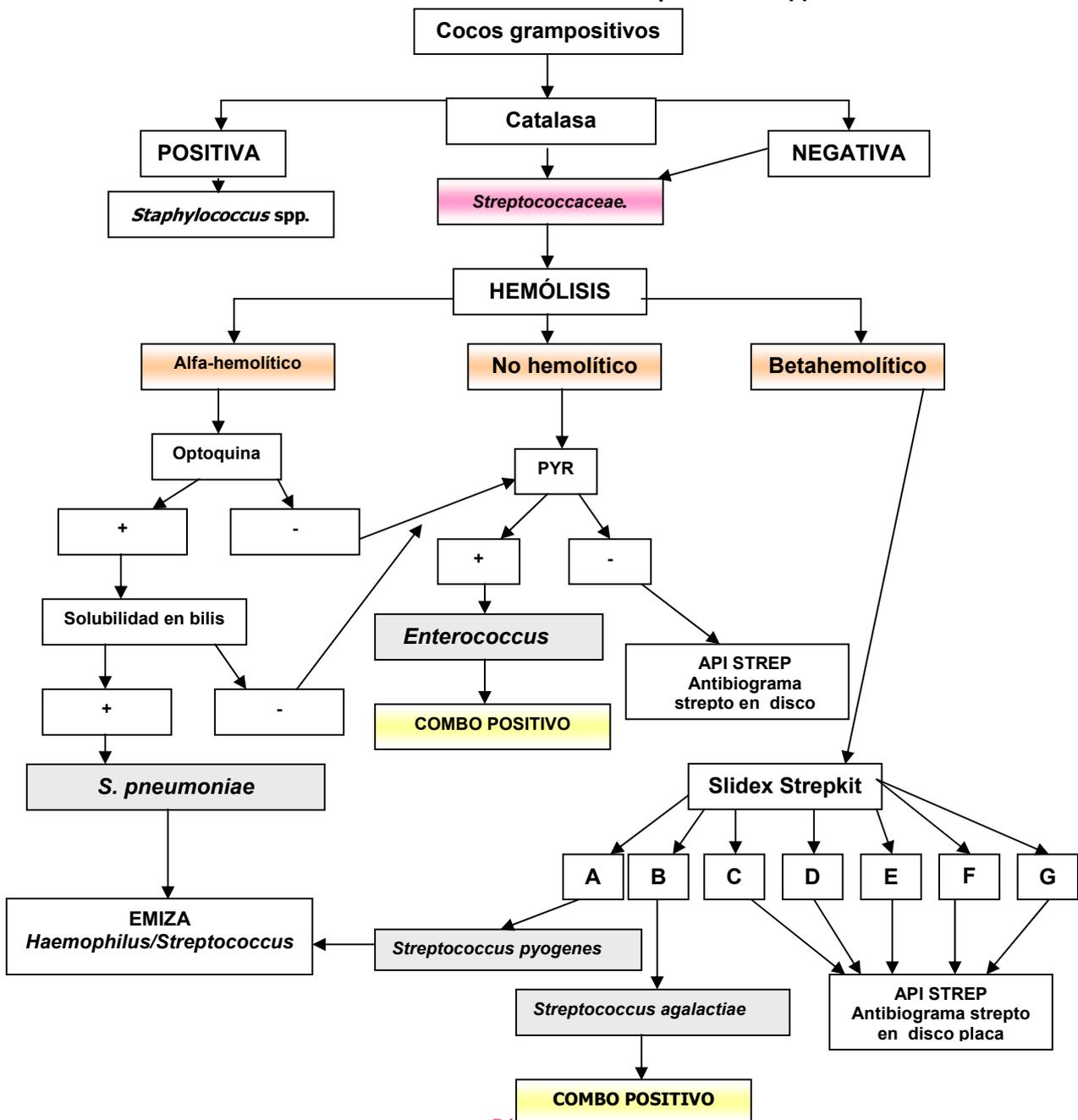
2. IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAMPOSITIVOS AEROBIOS: *Staphylococcus* spp.



	Hemólisis	Coagulasa	Manitol	Catalasa	Polimixina
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	R
<i>S. epidermidis</i>	+/-	-	-	+	R
<i>S saprophyticus</i>	-	-	+	+	S

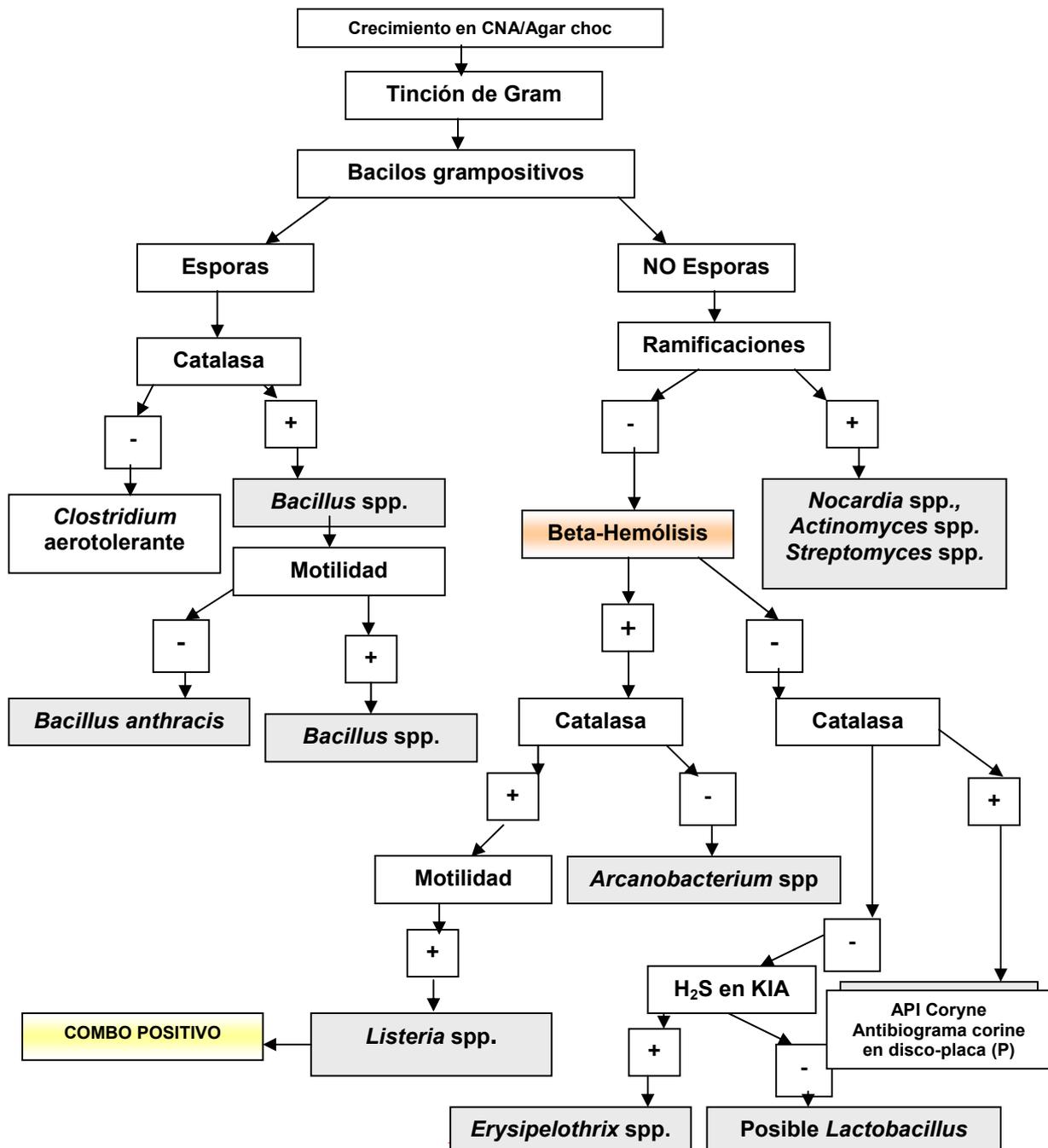
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 23 de 33

3. IDENTIFICACION DE COCOS GRAMPOSITIVOS AEROBIOS: *Streptococcus* spp.



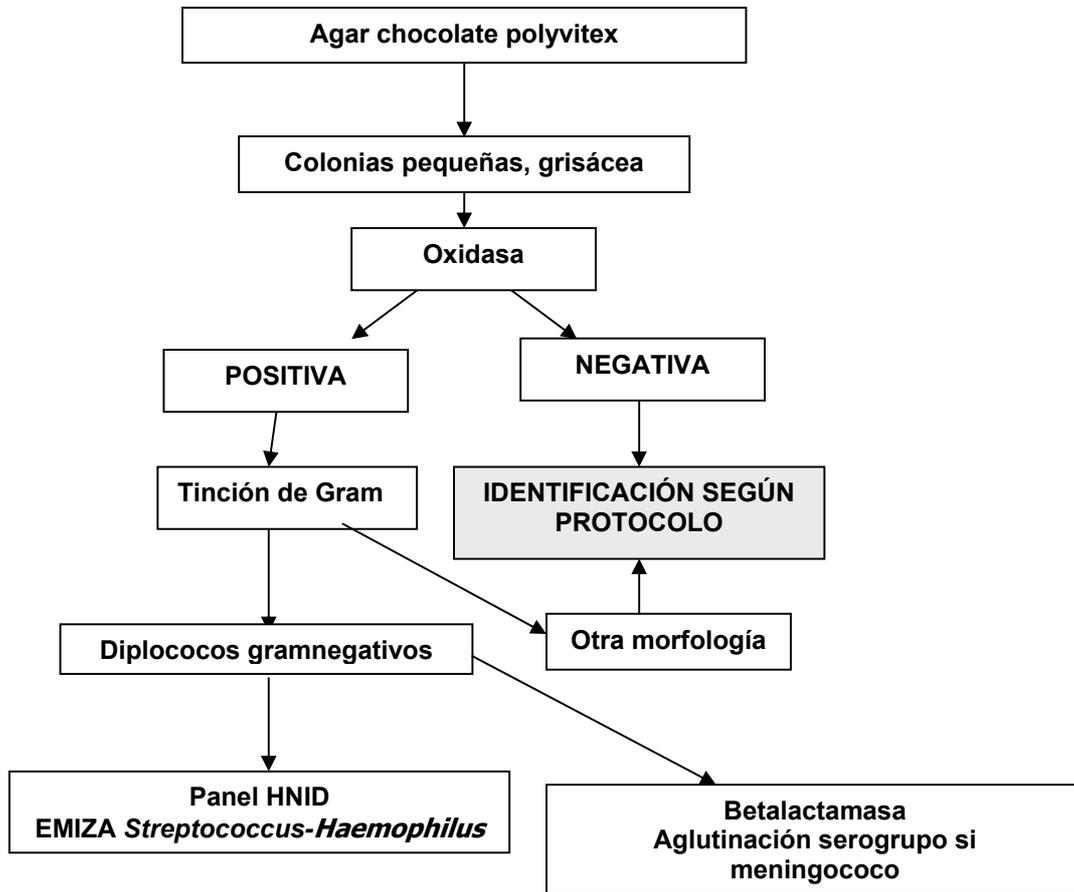
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 24 de 33

4. IDENTIFICACIÓN DE BACIOS GRAMPOSITIVOS AEROBIOS



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 25 de 33

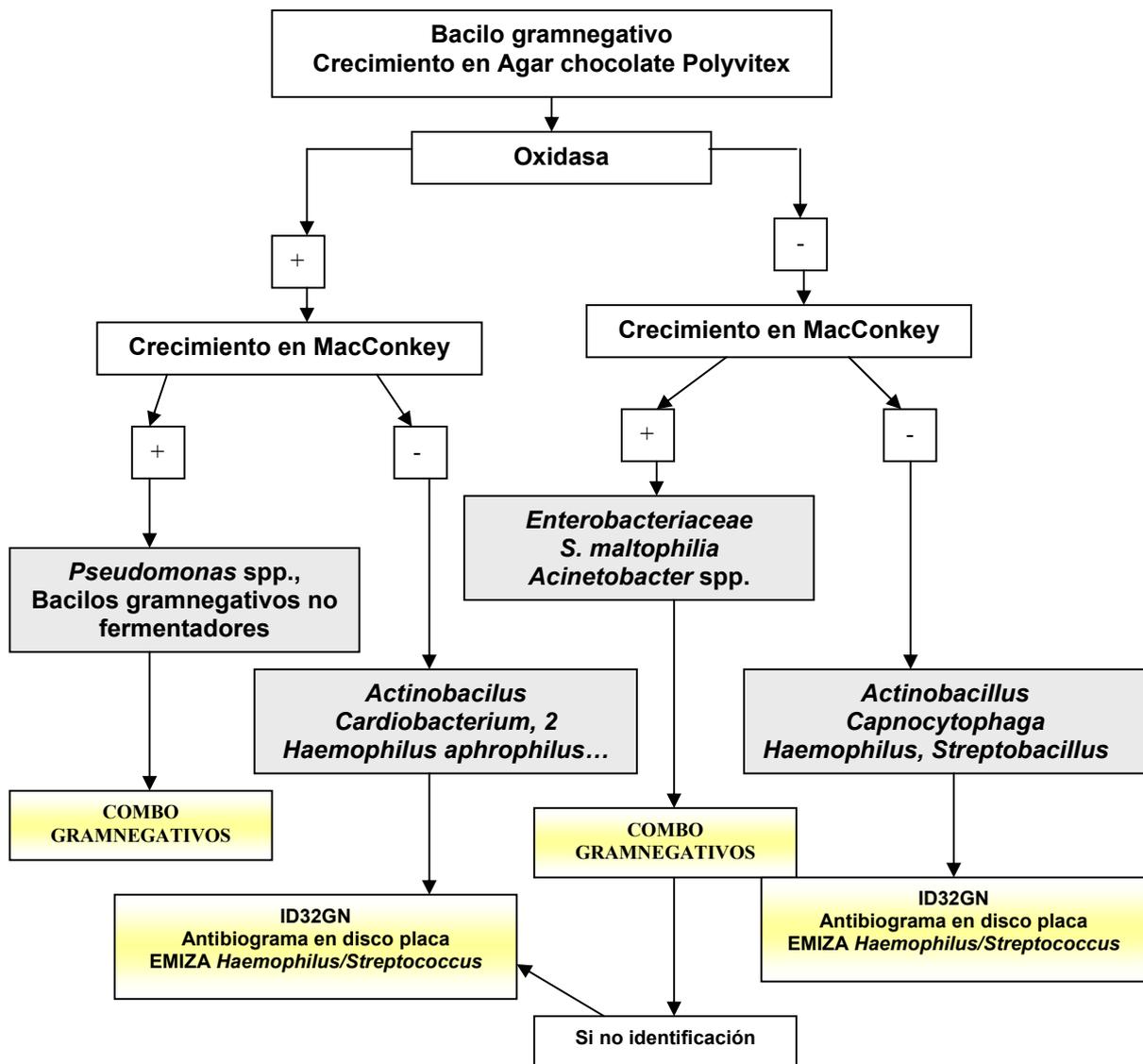
5. IDENTIFICACIÓN DE COCOS GRAMNEGATIVOS



	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. lactamica</i>
Glucosa	+	+	+
Maltosa	-	+	-
Lactosa	-	-	+
Resto de azúcares	-	-	-

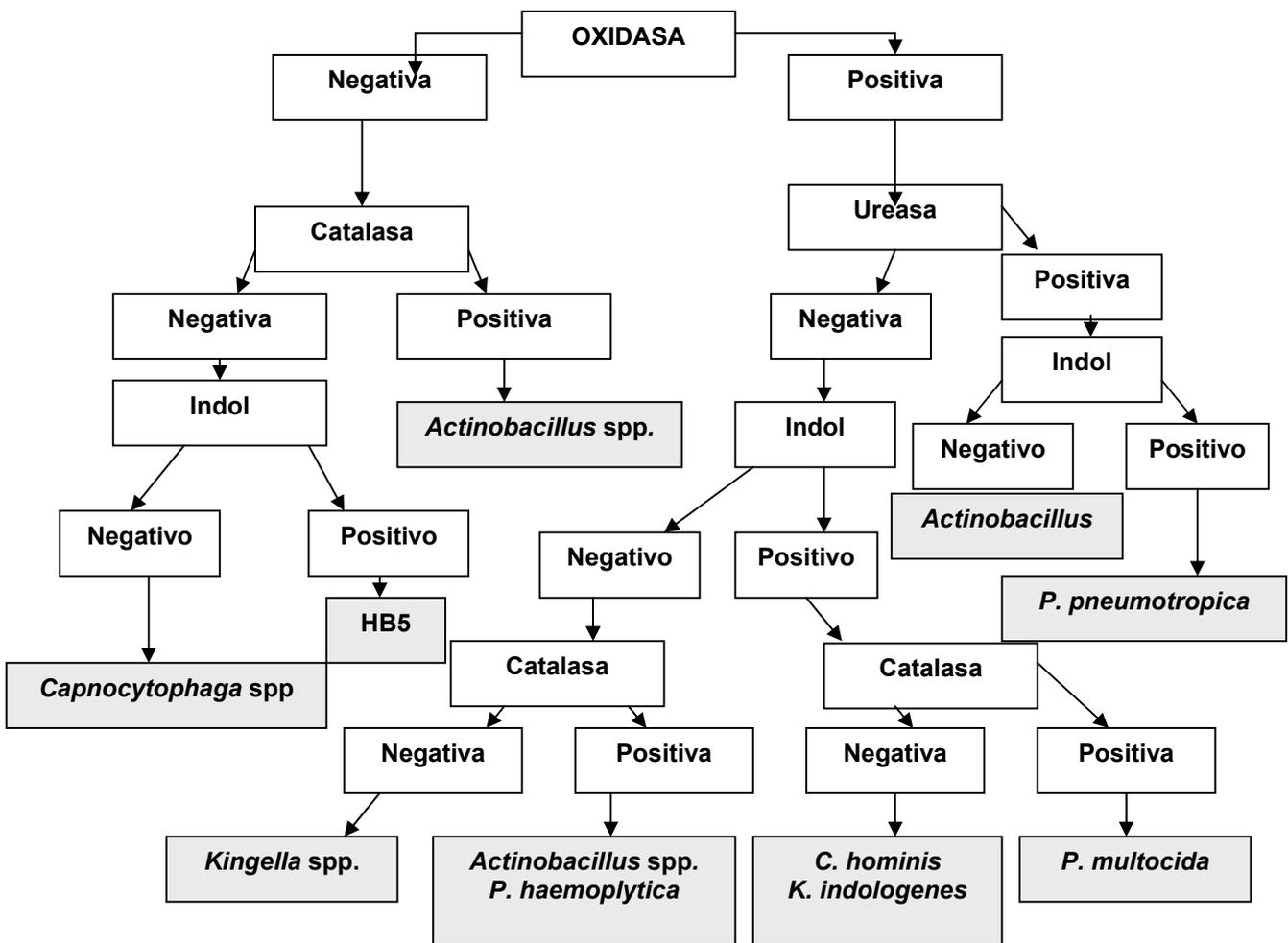
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 26 de 33

6. IDENTIFICACIÓN DE BACIOS GRAMNEGATIVOS AEROBIOS



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 27 de 33

Bacilos gramnegativos fermentadores, sin crecimiento en MacConkey



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 28 de 33

Pruebas bioquímicas básicas para la identificación de *Enterobacteriaceae*

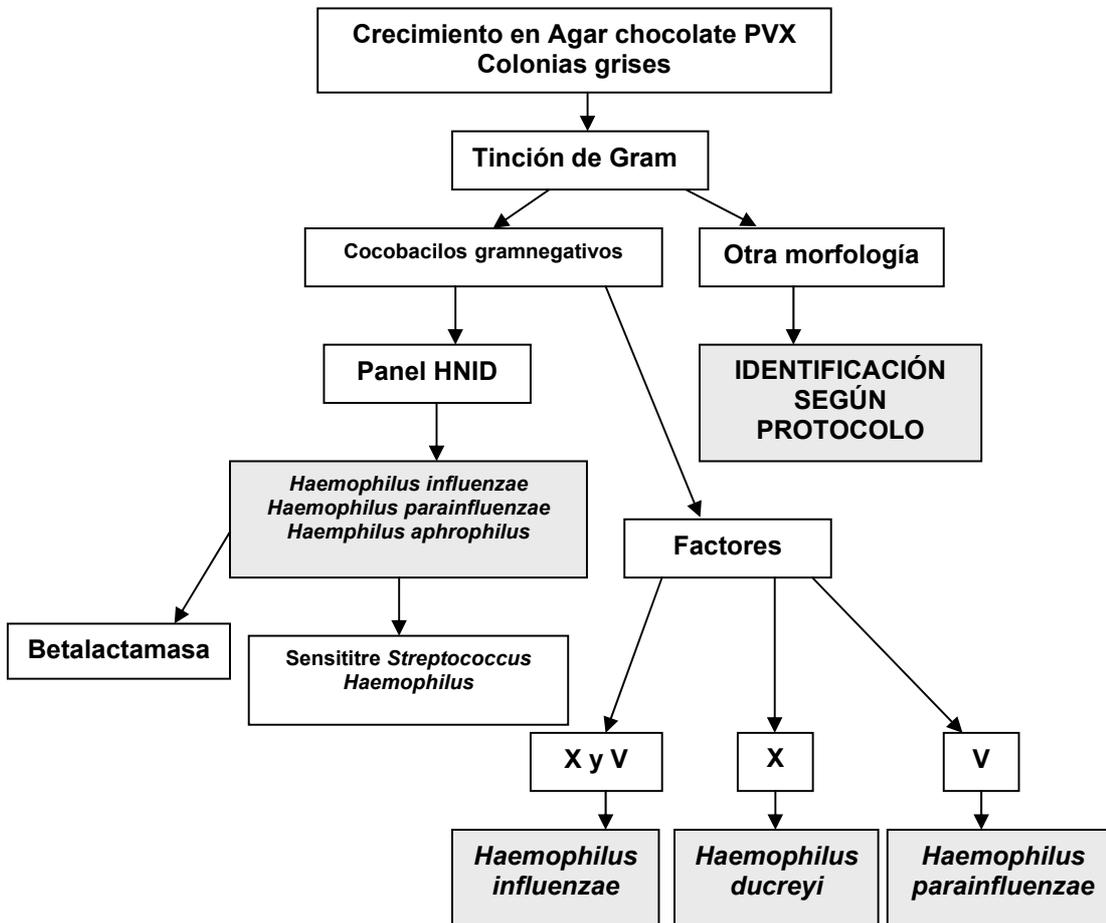
	Glu	Lac	H ₂ S	Gas	Motil (37°C)	Lys	Cit	Phe	Urea	Indol	ONPG	VP
<i>E. coli</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>P. mirabilis</i>	+	-	+	-	+	-	+(65)	+	+	-	-	+(50)
<i>P. vulgaris</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>M. morganii</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Prov. stuartii</i>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>K. oxytoca</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	+(65)	-	+	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	-	-	+(55)	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	+(78)	+	+	-	+	-	+(44)	+(33)	+	-

Pruebas bioquímicas básicas para la identificación de *Pseudomonas* spp.

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
Piocianina	+	-	-
Pioverdina	+	+	+
Desarrollo a 42°C	+	-	-
Hidrólisis gelatina	V	+	-
Fluorescencia	+	+	-

UNIDAD DE MICROBIOLÓGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 29 de 33

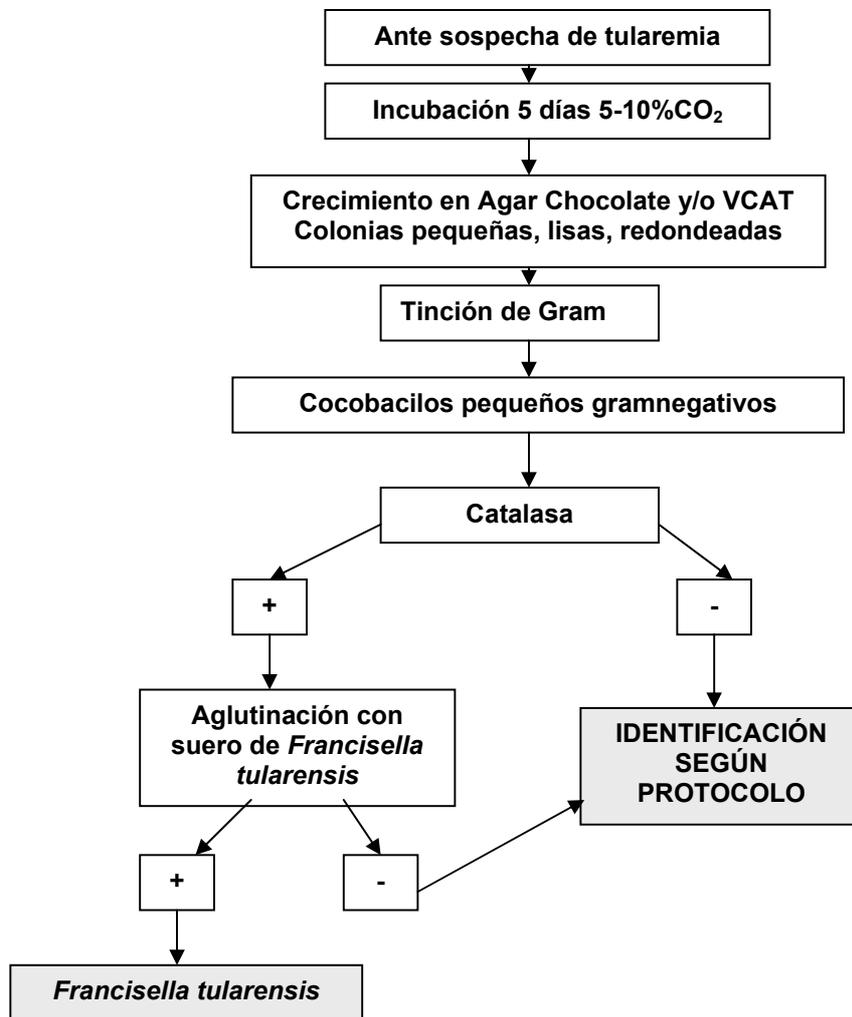
7. IDENTIFICACIÓN DE *Haemophilus* spp.



	Catalasa	Oxidasa	Factor X	Factor V	IDX	Glucosa	Sucrosa		
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	+	+	+	.		
<i>H. parainfluenzae</i>	+	+	-	+	+	+	+		
<i>H. aphrophilus</i>	-	+			+	+	+		
	Catalasa	Oxidasa	Factor X	Factor V	Indol	SPS	Reducción nitratos	Fosfatasa alcalina	ALA porfirina
<i>H. ducreyi</i>	-	+	+	-	-	S	+	+	-

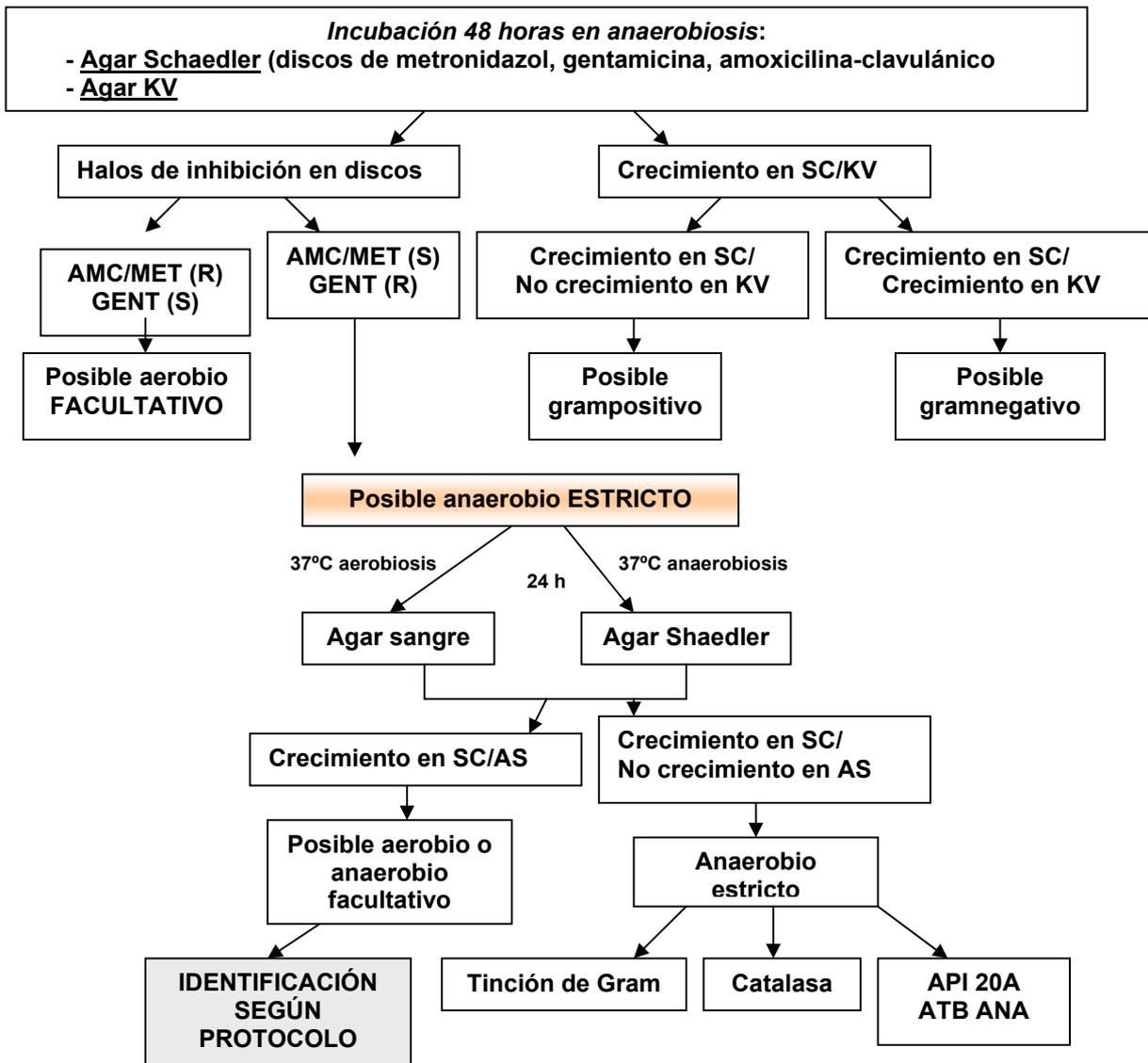
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 30 de 33

8. IDENTIFICACIÓN DE *Francisella tularensis*



UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 31 de 33

9. IDENTIFICACIÓN DE ANAEROBIOS



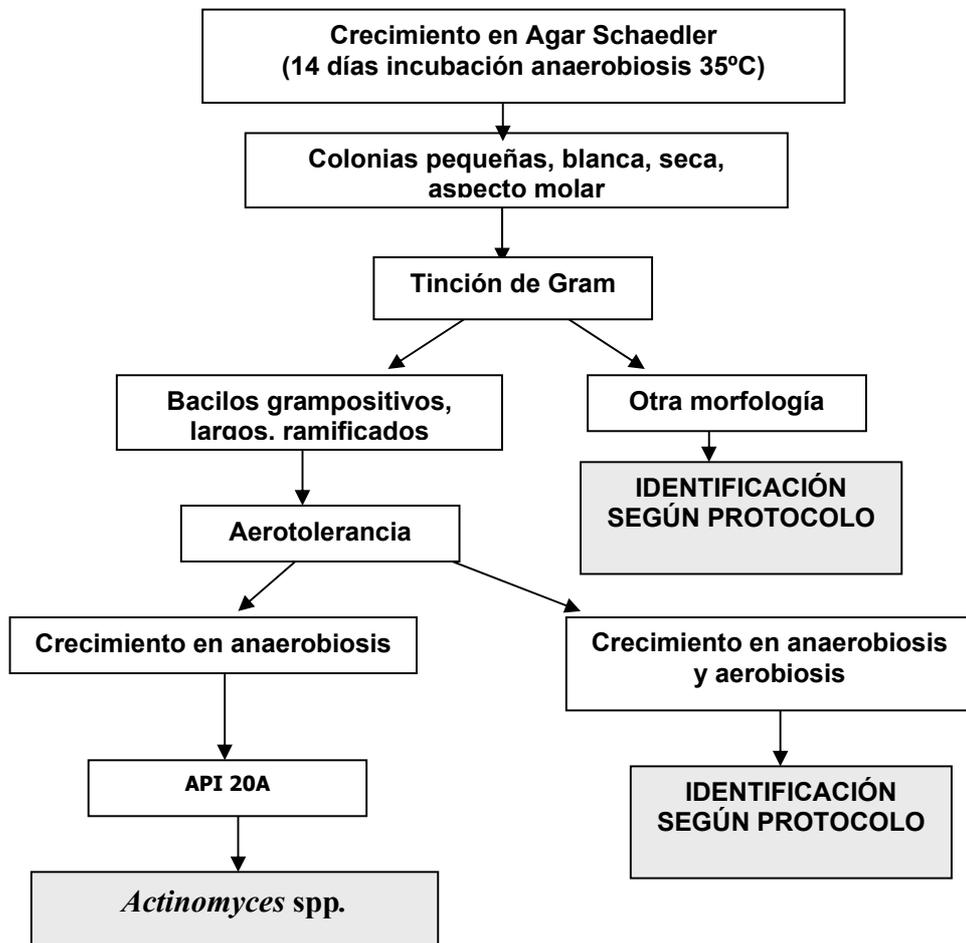
UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 32 de 33

Pruebas bioquímicas para la identificación de bacilos gramnegativos anaerobios

Microorganismo	Indol	Catalasa	Crec. bilis	Reducción nitratos	Lip	Esc	Rifampicina	Vancomicina	Kanamicina	Penicilina
<i>Bacteroides grupo fragilis</i>	V	V	+	-	-	V	S	R	R	R
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	-	-	-	+	-	S	R	S	S
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	-	-	-	-	-	S	R	S	S
<i>Porphyromonas spp</i>	+	-	V	-	V	-	S	R	R	S/R
<i>Prevotella spp.</i>	+	-	V	-	V	-	S	R	R	S/R

UNIDAD DE MICROBIOLOGÍA HOSPITAL VIRGEN DE LA CONCHA Gerencia Regional de Salud	PROCESAMIENTO ESPECÍFICO	
	Estudio microbiológico de las infecciones de piel y tejidos blandos	
	Edición: 01	Páginas: 33 de 33

10. IDENTIFICACIÓN DE *Actinomyces* spp.



	Urea	Gluc	Man	Lac	Sac	Malt	Sal	Xyl	Ara	Esc	Cel	Mne	Raf	Tre	Resto
<i>Actinomyces israelii</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>Actinomyces naeslundii</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**NORMAS DE PUBLICACIÓN**

- **Objetivo:** difundir conocimientos sobre calidad asistencial (metodología, objetivos de calidad, plan de calidad) que ayuden a mejorar la formación de todas aquellas personas implicadas en la mejora continua de la calidad.

- **Tema:** cualquier tema relacionado con calidad asistencial (objetivos de calidad, investigación, metodología, legislación, revisiones de temas concretos, revisiones bibliográficas, trabajos de investigación etc.).

- **Formato:** NuevoHospital se publicará en formato digital (disponible en la web) y en papel (trimestralmente). Todos los trabajos serán publicados en el formato digital.

Estructura de los trabajos:

- Título

- Autor/es

- Área - servicio ó unidad

- Función o cargo que desempeña/n

- RESUMEN

- Introducción (motivación, justificación, objetivos)

- Texto: según el tema que se trate

- en trabajos de investigación: material y métodos, resultados, comentarios-discusión
- en artículos de revisión bibliográfica: desarrollo del tema, comentarios-discusión

- Conclusiones

- Bibliografía

Formato de los trabajos:

- presentación **en MS-Word** (en disquette ó por correo electrónico)

- tipo y tamaño de letra: **Arial de 10 puntos**

- **tamaño de papel A4** (en el caso de ser enviados por correo ordinario, se ha de acompañar el disquette con una copia en papel)

- pueden incluirse tablas o dibujos (blanco y negro)

- en la versión digital podrán incluirse fotografías y gráficos en color

- **los trabajos han de tener el formato definitivo para ser publicados**

Modo de envío de los trabajos:

- por **correo ordinario:** Hospital Virgen de la Concha. Unidad de Calidad. Avda. Requejo Nº 35. 49022 Zamora
- **depositándolos directamente** en la Unidad de Investigación ó en la Unidad de Calidad (indicar en el sobre que es para publicar en la revista del Hospital)
- por **correo electrónico:** ucalid@hvcn.sacyl.es (disponible en la web: www.calidadzamora.com)

