

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA



EMPRESA SOCIAL DEL ESTADO
HOSPITAL SAN AGUSTIN DE
FONSECA

YELITZA DEL CARMEN AYALA
REDONDO
Gerente

02-02-2021



TABLA DE CONTENIDO

1. COLORACION DE GRAM	2
1.1. PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO.....	2
1.2. PROCEDIMIENTO:.....	3
1.3. RESULTADOS:.....	3
2. FROTIS VAGINAL Y CERVICAL	4
2.1. FROTIS VAGINAL.	4
2.2. TOMA DE MUESTRA.	4
2.3. EXÁMEN QUÍMICO	4
2.4. EXAMEN DIRECTO.....	5
2.5. RESULTADOS Y REPORTE	5
3. FROTIS DE SECRECIÓN URETRAL	7
4. INVESTIGACIÓN DE BACILOS ACIDO - ALCOHOL RESISTENTE (BAAR).....	8
4.1. TOMA DE MUESTRA	8
4.2. COLORACIÓN DE ZIEHL – NEELSEN.....	9
5. COLORACIÓN DE WRIGTH.....	10

1. COLORACION DE GRAM

La coloración de Gram es una prueba crítica, para el diagnóstico presuntivo y rápido de agentes infecciosos, también sirve para valorar la calidad de la muestra clínica.

La coloración de Gram es usada en el laboratorio para clasificar la bacteria con base en:

- a). Forma (cocos, bacilos, cocobacilos)
- b). Agrupación (pares, cadenas, racimo de uvas, tétradas)
- c). Reacción del Gram (Gram +, Gram -).

La división de las bacterias en Gram positivas está dada por diferencias físicas y químicas en la composición de la pared celular.

- Gram positivas: Su pared celular está compuesta en un 50 - 60 % por péptidoglicanos, en un 40 - 50 %, por ácido teicoicos y polisacáridos. El péptido glican le confiere dureza a la pared, la cual es más rígida y sólida que las de las Gram negativas. En las bacterias Gram positivas el cristal violeta se fija a la pared celular y con la adición del lugol (mordiente), se produce el complejo cristal violeta yodo que es resistente a la decoloración.

- Gram Negativas: La pared celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por una capa delgada de péptidos (5 - 10 %) recubriendo esta capa, se encuentra una membrana constituida por fosfolípidos, polisacáridos y proteínas. En ellos el decolorante libera el complejo cristal - violeta - Iodo, tomando la bacteria el colorante de contraste o secundario.

1.1. PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO

a). Muestra Clínica: Se toman con escobillones, rotar el escobillón suavemente sobre la lámina portaobjetos, en forma circular desde el centro hacia fuera. Las láminas deben ser nuevas, sin raya y limpias. Dejar secar al medio ambiente.

- Fijación del Extendido:

Se pueden fijar con el calor o metanol.


a). Calor: Una vez seco el extendido, se pasa dos o tres veces por la llama, no sobre calentar para evitar distorsión de las células y bacterias.

b). Metanol: Colocar una gota de metanol puro sobre la lámina y dejar un minuto, retirar el extendido de metanol sin lavar. Dejar secar.

- Coloración de Gram:

- Reactivos:

Cristal violeta



Lugol (yoduro de potasio)

Decolorante (Etanol 95% o alcohol (Acetona) Safranina.

1.2. PROCEDIMIENTO:

1. Fijar la preparación con calor.
2. Cubrir con cristal violeta x 1 minuto.
3. Lavar con agua.
4. Cubrir con lugol x 1 minuto.
5. Lavar con agua.
6. Cubrir con Etanol 95 % o alcohol acetona decolorante por 30 segundos.
7. Lavar con agua.
8. Cubrir con Safranina x 1 minuto.
9. Lavar con agua, dejar secar.

1.3. RESULTADOS:

Color púrpura = Gram Positivo

Color Rojo = Gram Negativo.

Precaución:

Filtrar los colorantes, medir el tiempo de coloración.

- Fuentes de error: Gram positiva falsa
- Colorante de Cristal Violeta que presenta sedimentos.
- Remoción incompleta del Lugol.
- Decoloración insuficiente del frotis.
- Tiempo prolongado con Safranina. Gramnegativo falsa
- Tiempo insuficiente con Lugol.
- Tiempo prolongado con alcohol Acetona o lavado incompleto.
- Forma De Reporte:
 - Reportar morfología bacteriana observada (iniciar con las más frecuente) indicando la agrupación y la cantidad.
 - Reportar, si los hubiere, la presencia de polimorfo nucleares y/o linfocitos.

- Indicar la presencia y cantidad de levaduras o micelios y células epiteliales

2. FROTIS VAGINAL Y CERVICAL

- Muestra genital

- Condiciones del paciente.

- Se puede tomar a cualquier hora del día.
- No aplicarse crema o espuma vaginal, ni hacerse lavado internamente en la cavidad vaginal.
- Si el paciente se encuentra con la menstruación debe aplazar el examen hasta 3 días después de no sangrar.
- La noche anterior o en la mañana antes de realizar el examen, la paciente no debe tener relaciones sexuales.

2.1. FROTIS VAGINAL.

La muestra debe ser tomada de los sacos vaginales y del exocervix y observar el color y aspecto de la secreción, se hacen dos extendidos por rotación en un portaobjeto para examen directo con coloración de Gram, luego con otro escobillón estéril se toma otra muestra para la mediación de pH sobre papel indicador y el test de aminas cuando se sospecha de vaginosis bacteriana posteriormente se introduce este escobillón en aproximadamente 1cc de solución salina estéril para realizar el examen en fresco .

2.2. TOMA DE MUESTRA.

Debe colocarse espéculo estéril preferiblemente desechable para visualizar el cuello uterino, y se toma la muestra sobre fondo de saco vaginal con escobillón estéril.

Al tomar la muestra se debe anotar las características microscópicas de la secreción: aspecto, color y olor.

En el caso de una infección producida por Vaginosis bacteriana, se observa una secreción blanca grisácea homogénea y adherente a las paredes vaginales.

Trichomona vaginalis, espumosa y mal oliente; Neisseria gonorrea o por Clamidia trachomatis tiene aspecto mucopurulenta de color amarillo, especialmente en el endocérnix.

En el caso de la secreción uretral en el hombre debe anotarse la presencia o evidencia de secreción; si está presente hay que tener en cuenta la intensidad de está ya que es profusa en la uretritis Gonocócica y más escasa en la uretritis no Gonocócica.

2.3. EXÁMEN QUÍMICO

- pH: El pH se determina con papel indicador.

• Test de Aminas: Se realiza colocando una gota de suspensión de la muestra de flujo o sobre una placa, a la cual se adiciona una gota de KOH al 10%, se interpreta como positiva cuando inmediatamente se detecta olor a pescado, explicable por la volatilización de Aminas existentes en la muestra, como producto del metabolismo de algunas bacterias anaeróbicas.

• Examen en fresco

Se realiza tomando del tubo que contiene solución salina, una gota de esta suspensión con el escobillón y se coloca en un portaobjeto, luego le colocamos encima un cubreobjeto y se observa al microscopio. Se tiene en cuenta la presencia de leucocitos, células guías, Trichomona vaginalis, conidias, blastoconidias y micelios.

2.4. EXAMEN DIRECTO

Se hace un extendido el cual se colorea con Gram, se deja secar y se observa al microscopio. En general un informe de flujo vaginal debe incluir:

- Color
- Aspecto
- Cantidad
- PH
- Fresco
- Gram
- Test de Aminas o KOH 10%

2.5. RESULTADOS Y REPORTE

En el examen en Fresco hay que informar la cantidad de bacterias por cruces de una a cuatro dependiendo de lo observado, se pueden observar células guías de la Vaginosis bacteriana que se reportan como ausentes o presentes dependiendo de la aparición de ellas o no.

Se realiza también una cuantificación de los leucocitos y células epiteliales observadas y se reporta el número por campo microscópico encontrados en 40x.

El informe de Gram en flujo vaginal y secreción uretral se realiza de la siguiente manera:

POLIMORFONUCLEARES (PMN).

0 PMN/campo

6-10 MN/campo

>10 PMN/campo

La presencia de PMN nos indica infección e inflamación.

Las bacterias se informan teniendo en cuenta su morfología y su reacción tintorial, especificando la cantidad en que estas se presenten reportándolas en cruces.

Para la interpretación e informe de la lectura del Gram, se tienen en cuenta los siguientes parámetros:

Cuantificación de:

- o Bacilos Gram positivos (*Lactobacillus* sp.)
- o Cocobacilos Gram variables (*G. vaginalis* + *Bacteroides* sp.)
- o Bacilos curvos Gram negativos (*Mobiluncus* sp.)

Las bacterias se cuantifican de 1+ a 4+ de acuerdo con el número que se encuentran por campo microscópico, con un aumento final de 1000X.

- 0+: No hay bacterias
- 1+: 1 bacteria/c
- 2+: 1 – 4 bacterias/c
- 3+: 5 – 30 bacterias/c
- 4+: Mayor de 30 bacterias/c

Una vez establecida la cantidad de *Lactobacillus* sp., *G. vaginalis* más *Bacteroides* sp. Y *Mobiluncus* se asigna un puntaje de acuerdo con la siguiente tabla:

Lactobacillus	G. vaginalis y Bacteroides sp.	Mobiluncus
4+ : 0 punto	4+ : 4 puntos	4+ : 2 puntos
3+ : 1 punto	3+ : 3 puntos	3+ : 2 puntos
2+ : 2 puntos	2+ : 2 puntos	2+ : 1 puntos
1+ : 3 puntos	1+ : 1 punto	1+ : 1 punto
0+ : 4 puntos	0+ : 0 punto	0+ : 0 punto

- La puntuación final se obtiene sumando los puntos de los tres grupos.

El criterio diagnóstico para Vaginosis bacteriana es una puntuación de 7 o más; una puntuación de 4 a 6 se considera como intermedia y una puntuación de 0 a 3 se considera normal.

El diagnóstico de la Vaginosis bacteriana se fundamenta en: cuadro clínico, aspecto del flujo, olor aminas, presencia de células guías, el elevado pH de la secreción vaginal, ausencia de *Lactobacillus* sp. y *Corinebacterium* sp, ausencia de reacción leucocitaria y presencia de bacilos curvos gram negativos.

PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LAS INFECCIONES VAGINALES MAS COMUNES					
CARACTERISTICA	VAGINA NORMAL	VAGINOSIS BACTERIANA	VULVOVAGINITIS POR Candida sp	TRICOMONIASIS	GONORREA O CERVICITIS
Agente etiológico	Ninguno. Predominio Lactobacillus sp	Gardnerella vaginalis asociada con bacterias	Usualmente Candida albicans anaerobia y Mycoplasmas	Trichomonas vaginalis	Neisseria gonorrhoeae
Sintomatología	Ninguno.	Flujo ligeramente aumentado y con mal olor. Puede haber irritación vulvar	Comezón y/o irritación vulvar. Disuria	Flujo abundante purulento, comezón e irritación vulvar. Puede haber disuria	Flujo purulento, edisuria e irregularidad menstrual.
Flujo	Cantidad variable (usualmente escasas), transparente o blanco, flocular. pH < 4.5	Cantidad moderada, blanco a gris, homogéneo o baja viscosidad. pH >4.5	Cantidad escasa, blanco grumoso. pH < 4.5	Abundante, amarillo verdoso, homogéneo. pH > 5.0	Flujo vaginal de amarillo verdoso. Puede ser asintomático.
Examen microscópico	Bacilos Gram positivos. Reacción leucocitaria escasa	Cocobacilos Gram Variables móviles. Reacción leucocitaria escasa.	Leucocitos en cantidad variable. Blastoconidias y pseudomicelios de Candida (80-90%) de los casos.	Leucocitos abundantes. Trichomonas (70% de los casos)	Diplococos Gram negativos intra y extracelulares. Leucocitos abundantes.

3. FROTIS DE SECRECIÓN URETRAL

- Muestra: Secreción uretral.
- Toma de muestra

Se puede tomar a cualquier hora del día preferiblemente en la mañana, se le indica al paciente que puede bañarse, sin lavarse los genitales con jabón ya que se retira la muestra al hacerse el lavado; si de alguna forma el paciente no siguió las indicaciones que se le dieron al momento de obtener la muestra se le hace un ligero masaje para que haya secreción.

Se debe preguntar si ha sentido prurito, ardor, fiebre, de qué color es la secreción y desde cuando la está presentando.

Luego se toma la muestra retrayendo el prepucio y rotando suavemente el escobillón sin maltratar al paciente, se toma pH, se anota el color, aspecto, se hace el extendido y se le toma otro escobillón para la solución salina.

- Procedimiento:

Se sigue el mismo procedimiento que se realiza con el frotis vaginal realizando la lectura de acuerdo a lo observado en el montaje en fresco y la coloración de Gram.

4. INVESTIGACIÓN DE BACILOS ACIDO - ALCOHOL RESISTENTE (BAAR)

TUBERCULOSIS: Enfermedad multifactorial (Nutrición, inmunosupresión, alcoholismo, fumadores, hacinamiento, necesidades básicas insatisfechas) producida por un bacilo de poca o nula patogenicidad con un período de replicación de 12 horas en el cual el daño tisular se debe a la reacción inmunitaria que trata de destruir al germen; al no lograrlo genera un proceso inflamatorio crónico. Factores que deprimen el sistema inmunológico pueden reactivar la infección aún después de muchos años de estar latente. La infección se realiza casi siempre en el pulmón, que es el órgano más afectado, la bacteria ingresa al organismo y puede vivir y multiplicarse en él.

4.1. TOMA DE MUESTRA

En Expectoración: seguir instrucciones para obtención de expectoración. Obtención de Expectoración:

1. Expectorar y depositar la muestra en un recipiente estéril de boca ancha. Si no fuera posible obtener una verdadera expectoración.
2. Sobre la cama colocar 2 almohadada y recostarse colocando el abdomen sobre ellas con la cabeza colgada.
3. Aspirar aire suficiente, levantar el tronco lo más que se pueda y regresar bruscamente a la posición anterior.
4. Depositar la expectoración en el recipiente estéril.
5. Se recomienda que la muestra sea la primera de la mañana y en ayunas para evitar partículas de alimentos

• En Orina:

Recolectar en un recipiente estéril la orina.

Todas las muestras deben recolectarse previo aseo genital con antisépticos y manejar todos los materiales en condiciones estériles.

4.2. COLORACIÓN DE ZIEHL – NEELSEN

- Fundamentos:

El bacilo tuberculoso, contiene una gran cantidad de lípidos (ácidos micólicos) en su pared. Lo cual significa que es difícil de colorear, pero una vez ha tomado el colorante, resiste la coloración del ácido más alcohol.

- Reactivos
- Fucsina fenicada
- Alcohol ácido
- Azul de metileno

- Muestra:

Espuito, Líquido Pleural, Linfa, Jugo Gástrico, Orina: Solo cultivo

- Procedimiento:

- o Realizar un extendido
- o Fijar el extendido con calor
- o Cubrir la preparación con fucsina fenicada en cantidad suficiente, aplicar calor hasta la emisión de vapor, repetir este procedimiento por un lapso de 10 minutos evitando la ebullición del colorante.
- o Lavar con agua de chorro.
- o Agregar alcohol ácido durante 1 minuto o hasta decolorar
- o Agregar azul de metileno por 2 minutos
- o Enjuagar con agua y dejar secar
- o Observar en el objetivo de inmersión.

- Resultados:

Bacilos ácidos al alcohol Resistente: Color Rojo

Baciloscopia positivo


Bacilos no ácidos al alcohol Resistente: Color Azul

Baciloscopia negativa.

Baciloscopia positivo se reporta por cruces. Negativo: No se observan BAAR

Positivo +: Cuando se observa menos de 1 BAAR en promedio en 100 campos observados. Positivo

++: cuando se observan de 1-10 BAAR por campo en promedio en 50 campos observados. Positivo +++: cuando se observan más de 10 BAAR por campo en promedio en 20 campos observados.



Control a los Colorantes: Se deben filtrar los colorantes.

Los controles positivos se hacen con BCG y con un cultivo de cualquier otro germen o con una muestra tomada de los carrillos, hacer un extendido. Colorear con la coloración de Ziehl Neelse.

5. COLORACIÓN DE WRIGTH

Esta coloración se utiliza para el examen diferencial de las células sanguíneas y para la identificación de hemoparásitos en preparación fina.

El colorante tiene un fijador en combinación con la solución colorante, de modo que la fijación y la coloración se realizan al mismo tiempo.

- Muestra:

Frotis de Sangre Finos: Se debe realizar sobre láminas nuevas, limpias y desangradas. Un frotis bien realizado es grueso en una extremidad fino en la otra. El extendido delgado debe tener por lo menos 2 cm de largo.

Largos rastros de sangre indican que el portaobjetos usado como extensor estaba sucio o deteriorado. Las vetas en la película generalmente son producidas por suciedad y los orificios en ella indican la presencia de grasa en el portaobjetos.

- Reactivos
- Colorante WRIGHT
- Alcohol metílico

Procedimiento:

- Cubra con colorante la superficie Durante 1 a 3 minutos (el tiempo varia con cada lote de colorante o marca comercial).
- Agregar una cantidad igual de buffer y mezcle soplando sobre la superficie Del líquido.
- Después de 4 - 5 minutos elimine colorante del portaobjetos con abundante agua. No vierta el colorante antes de lavar. Si así la hace se deposita un precipitado en el portaobjetos.

ELABORACIÓN INICIAL

CONTROL	FECHA	NOMBRES Y APELLIDO	CARGO
REALIZÓ	02-02-2021	Marieth Brito Cárdenas	Bacterióloga
REVISÓ	02-02-2021	Verenise Santiago F.	Auditora de Calidad
APROBÓ	02-02-2021	Yelitza Ayala Redondo	Gerente

CONTROL DE MODIFICACIONES

NOMBRE DOCUMENTO	CÓDIGO	VERSIÓN	FECHA MODIFICACIÓN	MODIFICACIÓN REALIZADA	RESPONSABLE
MANUAL DE MICROBIOLOGÍA	LABC-MA-010	01	02-02-2021	Todo el documento	Marieth Brito Cárdenas