MINISTERIO DE SALUD
Dirección de Redes Integradas
de Salud Lima Este

N° 522-2018-DG-DMGS-DA-OAJ-DIRIS LE/MINSA

DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE
SOLO PARA USO EXCLUSIVO DE LA INSTITUCION Y EL AMBITO JURISDICCIONAL
Fecha 28 AGO. 2018
SUSCRIBO QUE EL PTE. DOCUMENTO ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL
PEDRO SANTOS CASTILLO PORRAS
FEDATARIO
REGISTRO N° 0849

Resolución Directoral

Lima, 27 de Agosto de 2018

VISTO:

El Expediente N° 0115-2018, que contiene el Oficio N° 1000-2018-DMGS-LRSP N° 273-DIRIS-LE/MINSA, de la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria, y el Memorando N° 0283-2018-DA-DIRIS-LE/MINSA, de la Dirección Administrativa; y

CONSIDERANDO:

Que, en el marco del Decreto Legislativo Nº 1161, Ley de Organización y Funciones del Ministerio de Salud, y su Reglamento de Organización y Funciones aprobado con Decreto Supremo Nº 008-2017-SA y modificado con Decreto Supremo Nº 011-2017-SA, se crearon las Direcciones de Redes Integradas de Salud, incluyendo la Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este (DIRIS-LE), como órganos desconcentrados del Ministerio de Salud; asimismo, con Resolución Ministerial Nº 467-2017/MINSA publicada el 18.06.17, se aprobó el Manual de Operaciones de las Direcciones de Redes Integradas de Salud, incluyéndose a DIRIS-LE;

Que, en ese contexto, habiendo concluido entre otros, el Proceso de Transferencia de la ex Dirección de Salud IV Lima Este (ex DISA-IV-LE), es necesario que la DIRIS-LE dé continuidad a la prestación de servicios y procedimientos administrativos a cargo de la ex DISA-IV-LE de acuerdo al marco normativo vigente;

Que, mediante Oficio N° 1000-2018-DMGS-LRSP N° 273-DIRIS-LE/MINSA, de la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria ha solicitado que mediante acto resolutivo se apruebe el Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados del Laboratorio de Microbiología Clínica, considerando que su aprobación es requisito indispensable para las etapas de Categorización de establecimientos de apoyo al diagnóstico especializado, acreditación de ensayos de Laboratorio y supervisión del Instituto Nacional de Salud;

Que, la propuesta de Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados del Laboratorio de Microbiología Clínica tiene como Finalidad: la estandarización de los procedimientos para los análisis de microbiología, principalmente bacteriológicos, parasitológicos y micológicos de muestras biológicas;

Que, con Informe N° 017-2018-UFM-OPMGP-DA-DIRIS-LE/MINSA, la Oficina de Planeamiento y Modernización de la Gestión Pública señala que los referidos Manuales de Procedimientos Operativos Estandarizados: *"cumplen con los aspectos técnicos con respecto a la estructura establecida por la normatividad vigente..."*;

Que, la referida propuesta de Documento Técnico cumple con las disposiciones previstas en la "Norma para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", aprobado por Resolución N° 850-2016/MINSA;

Que, con la finalidad de continuar con el desarrollo de las actividades y procesos técnico-sanitarios a nivel institucional, así como alcanzar los objetivos y metas programadas en la DIRIS-LE, resulta pertinente atender lo solicitado por la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria, y en consecuencia emitir el correspondiente acto resolutivo aprobando el Documento Técnico: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE, de acuerdo al marco normativo vigente;

Que, el Artículo 8 Literal r) del Manual de Operaciones de las Direcciones de Redes Integradas de Salud, aprobada Resolución Ministerial Nº 467-2017/MINSA, establece las funciones de la Dirección General, entre las que se encuentran la de expedir Resoluciones Directorales en los asuntos de su competencia;

Con las visaciones de la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria, la Dirección Administrativa y la Oficina de Asesoría Jurídica;

De conformidad con las disposiciones contenidas en la Ley N° 26842, Ley General de Salud, y sus modificatorias; el Decreto Legislativo N° 1161, Ley de Organización y Funciones del Ministerio de Salud; y el Manual de Operaciones de las Direcciones de Redes Integradas de Salud, aprobado por Resolución Ministerial Nº 467-2017/MINSA; y

SE RESUELVE:

Artículo 1º.- Aprobar el Documento Técnico: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE, que forma parte de la presente Resolución Directoral como Anexo.

Artículo 2º.- Disponer la publicación de la presente Resolución Directoral, en el Portal de Transparencia de la Pagina Web de la Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este.

REGÍSTRESE Y COMUNÍQUESE

MINISTERIO DE SALUD
DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE
M.C. Leoncio Barrantzula Sarango
DIRECTOR GENERAL

Distribución:
( ) DG
( ) DMGS
( ) Archivo

DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE
SOLO PARA USO EXCLUSIVO DE LA INSTITUCION Y EL AMBITO JURISDICCIONAL
Fecha 28 AGO. 2018
SUSCRITO QUE EL PTE. DOCUMENTO ES FIEL COPIA DEL ORIGINAL
PEDRO SANTOS CASTILLO PORRAS
FEDATARIO
REGISTRO N° 6549

MINISTERIO DE SALUD

DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE

LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA LIMA ESTE

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA

REPUBLICA DEL PERU

PERÚ

Ministerio de Salud

Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA

Lima, 2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LE

MINISTERIO DE SALUD

DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE

LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA LIMA ESTE

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA

Dr. LEONCIO BARRANZUELA SARANGO
Director General de la DIRIS LIMA ESTE

Dra. VALENTINA ANTONIETA ALARCON GUIZADO
Directora Ejecutiva de la Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria

Lic. T.M. WILDER EDEN CHILCA RAMOS
Coordinador (e) del Laboratorio Referencial de Salud Pública

Lic. T.M. CINDY PINARES DIAZ
Resp. Laboratorio de Microbiología clínica.

Lima, 2018

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERÚ - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

INDICE

Pág.

INTRODUCCION 8

GENERALIDADES 9

I. FINALIDAD 9

II. OBJETIVOS 9

III. AMBITO DE APLICACIÓN 9

IV. BASE LEGAL 9

V. DISPOSICIONES GENERALES 9

5.1 DEFINICIONES 9
5.2 SIGLAS Y ABREVIATURAS 11

VI. DISPOSICIONES ESPECIFICAS 12

6.1 TOMA, CONSERVACION Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA 12

6.1.1 Previo a la toma de muestra 12

6.1.2 Obtención de muestra para cultivo de orina (Urocultivo) 12

6.1.3 Obtención de muestra de secreción faríngea 15

6.1.4 Obtención de muestra para cultivo de heces (Coprocultivo) 15

6.1.5 Obtención de muestra para cultivo de heces en pediátricos (Coprocultivo). 16

6.1.6 Hisopado rectal (Coprocultivo). 16

6.1.7 Obtención de muestra para cultivo de secreción vaginal 17

6.1.8 Obtención de muestra para cultivo de secreción uretral 17

6.1.9 Obtención de muestra para cultivo de heridas. 18

6.1.10 Obtención de muestra de Semen (Espermacultivo). 18

6.1.11 Obtención de muestras de lesiones compatibles con micosis superficiales 19

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD V°B° DIRIS - LIMA ESTE

6.1.12. Muestra para examen parasitológico (heces) 20

6.1.13 Obtención de muestra sanguinea para microscopia directa de Malaria 20

6.1.14 Obtención de frotis sanguineo para diagnostico directo de Bartonelosis 21

6.1.15 Obtención de frotis de lesion para diagnostico directo de Leishmaniasis 22

6.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO 22

6.2.1 Recepción 22

6.2.2 Manipulación 23

VII. RESPONSABILIDADES 23

VIII. BIBLIOGRAFIA 23

IX. LISTA DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS 24

POE N°01: COLORACIÓN GRAM 27

POE N°02: SIEMBRA PRIMARIA PARA CULTIVO DE ORINA (UROCULTIVO) 29

POE N°03: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA SOSPECHOSA DE *Neisseria gonorrhoeae* 34

POE N°04: SIEMBRA PRIMARIA DE HECES (COPROCULTIVO) 36

POE N°05: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECION FARINGEA 40

POE N°06: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECION VAGINAL 42

POE N°07: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HERIDAS 44

POE N°08: SIEMBRA PRIMARIA DE SEMEN (ESPERMOCULTIVO) 46

POE N°09: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: GENERO STAPHYLOCOCCUS 48

POE N°10: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSTIVOS: GENERO ENTEROCOCCUS 54

POE N°11: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: GENERO STREPTOCOCCUS 57

POE N°12: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM NEGATIVOS: GENERO NEISSERIA 61

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

POE N°13: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM NEGATIVOS: GENERO MORAXELLA 63

POE N°14: IDENTIFICACION DE COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO HAEMOPHILUS 65

POE N°15: IDENTIFICACION DE COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS GRAM VARIABLES: GENERO GARDNERELLA 68

POE N°16: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO CAMPYLOBACTER 70

POE N°17: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO AEROMONAS 73

POE N°18: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO PLESIOMONAS 75

POE N°19: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO PSEUDOMONA 77

POE N°20: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO ENTEROBACTERIACEAE 79

POE N°21: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO BRUCELLA 85

POE N°22: PREPARACION DEL AGAR MUELLER HINTON PARA PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER. 87

POE N°23: PRUEBA DE SENSIBILIDAD: METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) 89

POE N°24: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA STAPHYLOCOCCUS SPP 93

POE N°25: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA ENTEROCOCCUS SPP 96

POE N°26: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Pseudomonas aeruginosa* 99

POE N°27: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA GENERO ENTEROBACTERIACEAE 102

POE N°28: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Salmonella spp. y Shiguella spp.* 105

POE N°29: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER

(DISCO DIFUSION) PARA GENERO VIBRIO 107

POE N°30: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Streptococcus pneumoniae (Neumococo) 109

POE N°31: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Streptococcus spp (Excepto Neumococo) 112

POE N°32: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Haemophylus spp. 115

POE N°33: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Acinetobacter spp. 118

POE N°34: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) 121

POE N°35: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE AMP C MEDIADA POR PLASMIDO 125

POE N°36: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE AMP C MEDIADA POR PLASMIDO (TEST TRIDIMENSIONAL) 127

POE N°37: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE CARBAPENEMASAS "TEST DE HODGE MODIFICADO" 129

POE N°38: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE METALOBETALACTAMASAS. 132

POE N°39: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE RESISTENCIA INDUCIBLE A CLINDAMICINA. 134

POE N°40: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA PARA DETECCION DE RESISTENCIA A PENICILINA EN Staphylococcus spp. 136

POE N°41: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA PARA DETECCION DE RESISTENCIA A OXACILINA 138

POE N°42: IDENTIFICACION DE Candida Albicans 140

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD DIRIS - LIMA ESTE V°B°

POE N°43: EXAMEN DIRECTO CON HIDROXIDO DE POTASIO AL 10% 143

POE N°44: CULTIVO DE HONGOS 145

POE N°45: EXAMEN PARASITOLOGICO DIRECTO 147

POE N°46: EXAMEN PARASITOLOGICO METODO DE CONCENTRACION 150

POE N°47: BUSQUEDA DE HUEVOS DE *Enterobius vermicularis* 153

POE N°48: COLORACION GIEMSA PARA DIAGNOSTICO DIRECTO EN FROTIS Y GOTA GRUESA 156

X. ANEXOS 160

ANEXO N° 01: HALOS DE INHIBICION CLSI 2018-M100,28th ed 160

ANEXO N° 02: ELECCION DE METODO DE TOMA DE MUESTRA PARA INFECCION MICOTICA 162

ANEXO N° 03: PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTE GIEMSA 164

MINISTERIO DE SALUD DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE Laboratorio de Salud Pública V°B° DIRIS - LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD REPUBLICA DEL PERU Dirección Ejecutiva de Rectoría y Control Sanitario DIRIS LIMA ESTE

INTRODUCCION

La resistencia bacteriana es un tema de importancia en la Salud Pública. Su extensión a nivel mundial, el desarrollo de resistencia a nuevos agentes antimicrobianos, así como su presencia en patógenos relacionados con enfermedades prevalentes, como son la enfermedad diarreica aguda, las infecciones respiratorias agudas y las infecciones intrahospitalarias, le dan el carácter de problema prioritario. Por ello, el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces y, además, la información proporcionada por la vigilancia debe servir de insumo para la elaboración de un programa de uso racional de antibióticos.

Una de las escuelas de mayor influencia en el área de evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana es la americana, que cuenta con la norma editada anualmente por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), el manual que presentamos a continuación, toma como base éstas normas, igualmente, los manuales y normas emitidas por el Instituto Nacional de Salud de nuestro país.

El propósito de este manual es el de asistir al personal del Laboratorio de Microbiología del Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE. a entender los principios y la práctica de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para proveer reportes de susceptibilidad correctos y guiar el tratamiento del paciente. Tiene un carácter práctico y permite hacer consultas de acuerdo a la bacteria con la que se está trabajando (por género). De esta manera, los especialistas en enfermedades infecciosas, epidemiólogos y otros funcionarios responsables por la Salud Pública podrán reconocer el desarrollo de nuevos patrones de resistencia a agentes antimicrobianos, esto a su vez les permitirá implementar nuevas medidas para limitar la difusión de organismos resistentes a través de los hospitales y la comunidad.

El documento hace énfasis en el método de difusión por disco el cual ha sido certificado como exacto, reproducible, técnicamente simple y relativamente económico. También se nota la importancia del control de la calidad para que exista confianza en la certeza de los resultados.

Para lograr altos estándares de calidad es necesario el seguimiento, supervisión y evaluación de las diferentes fases del laboratorio: pre analítico, analítico y post analítico. Con este manual esperamos contribuir al mejoramiento de los procedimientos y servicio que presta el Laboratorio Clínico.

MINISTERIO DE SALUD DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE Laboratorio de Salud Pública V°B° DIRIS - LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - DIRIS LIMA ESTE

GENERALIDADES

El presente Manual de Procedimientos Operativos Estandarizados de Microbiología Clínica de la Dirección de Laboratorio de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE, es un instrumento descriptivo y de sistematización normativa que presenta las actividades analíticas relacionadas a las principales pruebas del área de Microbiología Clínica.

I. FINALIDAD

El Manual tiene por finalidad la estandarización de los procedimientos para los análisis microbiológicos, principalmente bacteriológicos, parasitológicos y micológicos, de muestras biológicas.

II. OBJETIVOS

- Instruir e informar al personal sobre los procedimientos a realizar en el Laboratorio de Microbiología Clínica.
- Uniformizar y controlar el cumplimiento de los procedimientos, evitando las alteraciones arbitrarias.
- Simplificar las actividades relacionadas con los procedimientos estandarizados.
- Facilitar el trabajo del personal nuevo en el laboratorio de Microbiología Clínica.

III. AMBITO DE APLICACIÓN

El presente manual será de conocimiento a todo el personal que presta servicios en el Laboratorio de Microbiología Clínica, y su aplicación es de carácter obligatorio.

IV. BASE LEGAL

Ley N° 26842 Ley General de la Salud.

Ley Nª 27657 Ley del Ministerio de Salud.

RM Nº 011-2014/MINSA - Directiva para la Formulación de documentos Técnicos Normativos de Gestión Institucional.

Ley Nª 27658-Ley Marco de Modernización de la Gestión del Estado.

Ley Nª 27444-Ley de Procedimiento Administrativo General.

RM 850-2016/MINSA "Normas para la Elaboración de Documentos Normativo".

V. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 DEFINICIONES

- **Antibiótico:** antibiótico: Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos.

- **Agar:** Sustancia mucilaginosa que se extrae de algunas algas, utilizada como medio de cultivo, en farmacia, en bacteriología y en ciertas industrias.

- **Bacteria**: Microorganismo unicelular sin núcleo diferenciado, algunas de cuyas especies descomponen la materia orgánica, mientras que otras producen enfermedades.

- **Bioseguridad**: Conjunto de medidas preventivas para proteger la salud y la seguridad humana y del ambiente, frente a diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánico.

- **Cepa**: Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.

- **Colonia**: Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.

- **Crioconservación:** Congelamiento y almacenamiento de células vivas a muy bajas temperaturas.

- **Cultivo:** Método de obtención de microorganismos, células o tejidos mediante siembras controladas en medios adecuados.

- **Disco de sensibilidad**: Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.

- **Escala de McFarland**: Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.

- **Esterilización:** Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.

- **Halo de inhibición**: zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el gérmen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al gérmen.

- **Incubación**: Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación.

- **Inóculo**: Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo.

- **Intermedio (i):** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Esta categoría incluye las cepas bacterianas que pueden ser inhibidas por concentraciones del antibiótico superiores a las obtenidas con las dosis habituales, siempre y cuando se puedan aumentar las dosis empleadas y/o que el antibiótico se concentre fisiológicamente en el tejido o lugar infectado.

- **Medio de cultivo**: Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana in vitro.

- **Microaerofílico:** Organismo que crece y se reproduce mejor en la presencia de una tensión de 5% de oxígeno, 10% de anhidrido carbónico y 85% de nitrógeno.

- **Muestra:** Parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella con ciertos métodos para someterla a estudio, análisis o experimentación.

- **Micosis:** Infección producida por ciertos hongos en alguna parte del organismo.

- **Quiste:** es un estado de reposo o inactividad de un microorganismo, usualmente bacterias o protistas o raramente un animal invertebrado, que ayuda al organismo a sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables. Forma vegetativa infectante y de resistencia.

- **Reconstituir:** Restablecer la forma original de una sustancia previamente alterada para su conservación y almacenamiento, mediante la combinación con un líquido adecuado.

- **Registro:** Documento que provee evidencias objetivas de las actividades efectuadas o de los resultados obtenidos.

- **Resistente (R)**: Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.

- **Sensible (S):** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones.

- **Trofozoito**: es la forma vegetativa activada que se alimenta generalmente por fagocitosis y se reproduce.

- **Unidades formadoras de colonia (UFC):** Son el número mínimo de células separables sobre la superficie o dentro de un medio de agar semisólido, que da lugar al desarrollo de una colonia visible del orden de decenas de millones de células descendientes. En el recuento de UFC de un cultivo de microorganismos solo se consideran las células viables.

5.2 SIGLAS Y ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection.

DIRIS: Dirección de Redes Integradas de Salud

LIA: Agar Lisina Hierro

POE: Procedimiento Operativo Estandarizado

TSI: Hierro triple azúcar

UFC: Unidades formadoras de colonia

VP: Vogues Proskauer

XLD: Xilosa lisina desoxicolato

VI. DISPOSICIONES ESPECIFICAS

6.1 TOMA DE MUESTRA

6.1.1. PREVIO A LA TOMA DE MUESTRA

Realizar el llenado de la solicitud y etiqueta que identificará la muestra con los datos del paciente (nombres y apellidos, edad, fecha y hora de recolección). Posteriormente, preparar el equipo necesario para la obtención (como se estipula en cada uno de los rubros), colocar y transportar correctamente la muestra, ya que la obtención de microorganismo se puede ver alterada por diversos factores tales como: tiempo, contenedor, contaminación externa.

6.1.2. OBTENCION DE MUESTRA PARA CULTIVO DE ORINA (UROCULTIVO)

Condiciones Generales:

- Procesar la muestra de orina dentro de las 2 h después de haber sido obtenida o refrigerar a 4 °C (máximo 24 horas) hasta su procesamiento.
- Generalmente, el desarrollo de dos o más tipos de colonias (en pacientes sin sonda vesical) indica que la muestra se ha contaminado por recolección incorrecta o demora en la siembra.

A. Orina Chorro Medio

Recomendaciones:

- Realizar higiene de genitales:
  En la mujer, es necesario lavar el vestíbulo vaginal y la entrada de la uretra con agua jabonosa, enjuagar con abundante agua. Secar y lavar con solución yodada, quitar el exceso de solución con gasa. Separar los labios e iniciar la micción.
  En el hombre, hacer retracción del prepucio y lavar el glande y meato urinario con agua jabonosa, enjuagar con abundante agua y secar, lavar con solución yodada, quitar el remanente de solución con gasa. En todo momento, el prepucio deberá estar retraído.

MINISTERIO DE SALUD DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD Laboratorio de Salud Pública V°B° DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD REPÚBLICA DEL PERÚ DIRIS LIMA ESTE

- Recoger la muestra de la primera micción del día, de no ser posible la recolección de la primera orina de la mañana, pasar por lo menos 3 horas desde la última micción para recolectar la muestra de orina.
- NO está indicada para identificación de anaerobios.
- Es una muestra importante para la detección de infecciones causadas por piógenos comunitarios e intrahospitalarios, también levaduras.

Técnica de recolección:

- Explicar el procedimiento al paciente incluyendo la técnica de asepsia.
- Rotular el frasco con el nombre completo del paciente, edad, fecha y hora de recolección.
- Desechar los primeros 5-10 mL en el inodoro, comenzar a recolectar la muestra de orina subsecuente (orina del chorro medio).
- Recolectar como mínimo 10 mL de orina.
- Eliminar el resto de la orina en el inodoro.
- Tapar perfectamente el frasco recolector para evitar que la orina se salga y contamine.
- Enviar inmediatamente al laboratorio.

B. Orina por Sonda Vesical y Nefrostomía

Recomendaciones:

- Recolectar la muestra de la marca de agua de la sonda. En caso de que la sonda empleada no tenga marca de agua, realizar asepsia en la zona del conector de la sonda. Pinzar la sonda aproximadamente a 10 cm del conector durante 5-10 minutos, se retirará la bolsa.
- Realizar asepsia del conector.
- La muestra nunca deberá ser tomada de la bolsa.
- Si se sospecha de infección de vías urinarias, realizar cambio de sonda y posteriormente mandar el Urocultivo para poder interpretar mejor los resultados microbiológicos, ya que las sondas se colonizan conforme pasan los días y pueden dar resultados falsos positivos.

Sondas con Marca de Agua

Técnica de recolección:

- Explicar el procedimiento al paciente.
- Pinzar la sonda aproximadamente a 5 cm por debajo de la marca de agua.
- Rotular la jeringa con el nombre completo del paciente.
- Realizar asepsia con solución yodada en la marca de agua.
- Esperar a que se acumule la orina suficiente para extraerla.
- Con una jeringa estéril, puncionar la marca de agua y extraer la orina, mínimo 10mL.
- Poner el tapón de la jeringa con mucho cuidado, valerse de una superficie plana para evitar accidentes.
- Enviar inmediatamente al laboratorio.

Sondas sin Marca de Agua.

Técnica de recolección:

- Explicar el procedimiento al paciente.
- Rotular el frasco con el nombre completo del paciente, edad, fecha y hora de recolección.
- Pinzar la sonda aproximadamente a 5 cm por debajo de la "Y".
- Realizar asepsia con solución yodada en la zona a de unión del catéter a la bolsa colectora y al separarlas.
- Esperar a que se acumule la orina suficiente para extraerla; retirar la pinza.
- Colocar el frasco recolector estéril en el orificio de salida de la sonda, sin tocar la parte interna con el mismo.
- Enviar inmediatamente al laboratorio.

Figura 2. Recolección de muestra de orina proveniente de una sonda que no tiene marca de agua.

Sondas Nelaton.

Técnica de recolección:

- La cateterización es realizada por el personal médico o de enfermería.
- Explicar al paciente el procedimiento.
- Rotular el frasco con el nombre completo del paciente, edad, fecha y hora de recolección, número de cama (si lo amerita).
- Realizar técnica aséptica para la limpieza de la sonda.
- Pinzar la sonda aproximadamente a 5 cm por arriba del conector.
- Limpiar con solución yodada el área del conector.
- Retirar la pinza.
- Recolectar la orina en un recipiente de boca ancha, estéril y tapón de rosca.
- Tapar el recipiente.
- Pinzar de nuevo la sonda.
- Retirar la sonda.
- Enviar inmediatamente al laboratorio.

C. ORINA CHORRO MEDIO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS

Recomendaciones:

- Realizar higiene de genitales:

En niñas, lavar desde la pelvis hasta el vestíbulo vaginal y la entrada de la uretra con agua jabonosa, enjuagar con abundante agua. Secar y quitar el exceso con gasa estéril.

En niños, hacer retracción del prepucio y lavar desde la pelvis hasta el glande y meato urinario con agua jabonosa, enjuagar con abundante agua y secar, quitar el remanente con gasa estéril.

- Recoger la muestra de la primera micción del día, de no ser posible la recolección de la primera orina de la mañana, debe pasar por lo menos 3 horas desde la última micción para recolectar la muestra de orina.
- NO está indicada para identificación de anaerobios.

Técnica de recolección:

- Explicar el procedimiento al paciente.
- Realizar técnica de asepsia.
- Colocar la bolsa recolectora dependiendo el género del paciente.
- Fijar la bolsa recolectora.
- Monitorear que el paciente haya orinado la cantidad suficiente (mínimo 10 mL)
- Una vez obtenido el volumen adecuado se deberá retirar la bolsa recolectora y sellar.
- Rotular la bolsa con el nombre completo del paciente, edad, fecha y hora de recolección.
- Enviar inmediatamente al laboratorio con extrema precaución para evitar el derrame de orina y por consecuencia la contaminación de la misma.

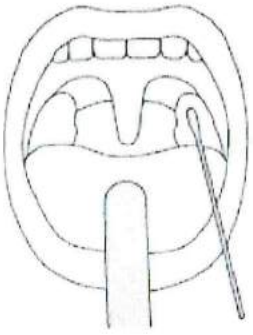
6.1.3. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SECRECIÓN FARÍNGEA

Recomendaciones:

- No asear la cavidad oral previa a la toma de muestra.
- El hisopado de garganta está contraindicado en pacientes con epiglotitis.

Técnica de recolección:

- Colocar al paciente bajo una fuente de luz.
- Levantar ligeramente la cabeza del paciente.
- Con un bajalenguas, presionar la lengua hacia abajo para visualizar los pilares de la faringe y del área de amígdalas para localizar el área de inflamación y exudado.
- Evitar tocar lengua, dientes y úvula.
- Rotar el hisopo sobre el área.
- Introducir el hisopo estéril en el tubo con medio de transporte.
- Rotular el tubo con medio de transporte con el nombre completo del paciente, edad, fecha y hora de recolección de muestra.
- Enviar inmediatamente al laboratorio.



6.1.4. OBTENCIÓN DE MUESTRA PARA CULTIVO DE HECES (COPROCULTIVO)

MINISTERIO DE SALUD DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE Laboratorio de Salud Pública V°B° DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD REPÚBLICA DEL PERÚ DIRIS LIMA ESTE

Recomendaciones:

- Excluir este procedimiento en heces sólidas y formadas.
- No agregar soluciones preservadoras como formalina, ya que esto es perjudicial para los microorganismos.
- Para cultivo de *Clostridium difficile* las muestras deben ser diarreicas.

Técnica de recolección:

- Explicar el procedimiento al paciente.
- Recolectar materia fecal de donde se vea la presencia de melena, moco o diarrea en envase de boca ancha y tapa rosca.
- Rotular el envase, con el nombre completo del paciente, # de registro, edad, fecha y hora de recolección de muestra.
- Enviar al laboratorio lo antes posible.

Transporte:
Se recomienda enviar en los primeros 15 minutos de la recolección, no exceder de dos horas y a temperatura ambiente.

6.1.5 OBTENCION DE MUESTRA PARA CULTIVO DE HECES EN PEDIÁTRICOS (COPROCULTIVO).

Muchos niños con diarrea, en especial los más pequeños, no siempre son capaces de avisar cuando van a mover el vientre. Por lo tanto, seguir los siguientes procedimientos:

- No orinar dentro del recipiente. Orinar antes de recolectar la muestra fecal.
- Utilizar un emvase plástico con forma de sombrero para recolectar la muestra. Colocar este dispositivo rápidamente sobre el inodoro o debajo del trasero del niño para recolectar la muestra. El uso de un dispositivo de recolección puede evitar la contaminación de las heces con agua del inodoro.
- Utilizar un envoltorio plástico para forrar el pañal de un bebé o un niño pequeño que aún no usa el inodoro. El envoltorio se debe colocar de manera tal que la orina se derrame hacia el pañal y no hacia el envoltorio.
- La materia fecal se debe colocar en frascos de plástico, limpios y secos con tapas a rosca, esta debe estar rotulada con nombre completo del paciente, edad, fecha y hora de toma de muestra.
- Para obtener mejores resultados, llevar la muestra al laboratorio en el lapso de unas pocas horas.

Transporte: Se recomienda enviar en los primeros 15 minutos de la recolección, no exceder de dos horas y a temperatura ambiente.

6.1.6. HISOPADO RECTAL (COPROCULTIVO).

Recomendaciones:
Muestra útil en pacientes con diarrea aguda, pues diferencia entre diarrea inflamatoria de aquella que no es. De apoyo para discernir entre enfermedades parasitarias o infecciones bacterianas.

MINISTERIO DE SALUD DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE Laboratorio de Salud Pública V°B° DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD REPÚBLICA DEL PERÚ Dirección Ejecutiva de Medicina y Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento DIRIS LIMA ESTE

Técnica de recolección:

- Explicarle al paciente el procedimiento que se le va a realizar.
- Rotular el tubo con el nombre completo del paciente, edad, # de registro, fecha y hora de toma de muestra.
- Poner al paciente decúbito lateral.
- Introducir el hisopo en el ano unos 5 cm aproximadamente y rotar.
- Sacar el hisopo y ponerlo en solución salina isotónica.
- Enviar inmediatamente al laboratorio de microbiología.

Transporte: Se recomienda enviar en los primeros 15 minutos de la recolección, no exceder de 2 horas y a temperatura ambiente.

6.1.7. OBTENCIÓN DE MUESTRA PARA CULTIVO DE SECRECIÓN VAGINAL

Recomendaciones:

Informar al paciente sobre omitir lavados vaginales, antibióticos, soluciones antisépticas vaginales, óvulos ni pomadas 24 horas antes de realizar la toma de muestras.

Técnica de recolección:

- Explicar el procedimiento a la paciente.
- Rotular un tubo de solución salina isotónica y los medios de cultivo en la parte posterior con el nombre completo del paciente, # de registro, edad, fecha y hora de recolección de muestra. Rotular con un lápiz el portaobjetos con el nombre completo del paciente.
- Colocar a la paciente en posición ginecológica e introducir el espéculo (espejo) vaginal sin lubricante.
- Bajo visión directa, tomar la muestra de las paredes vaginales con un cepillo citológico o en su defecto, con un hisopo.
- Inocular el agar sangre humana 5%, agar Thayer-Martin y otros medios disponibles.
- Nuevamente bajo visión directa, tomar la muestra de las paredes vaginales con un cepillo citológico o en su defecto, con un hisopo y realizar un extendido en el portaobjetos.
- Introducir el cepillo o hisopo en solución salina isotónica estéril.
- Enviar inmediatamente al laboratorio de Microbiología.

Nota: Si no se pudiera inocular en agar directamente, solo enviar el hisopo o cepillo en solución salina isotónica estéril inmediatamente al laboratorio.

Transporte: Se recomienda enviar en los primeros 15 minutos de la recolección, no exceder de 2 horas y a temperatura ambiente.

6.1. 8. OBTENCIÓN DE MUESTRA PARA CULTIVO DE SECRECION URETRAL

Recomendaciones:

Informar al paciente sobre omitir la primera micción del día o en su defecto esperar por lo menos una hora después de haber orinado.

Técnica de recolección:

- Explicar el procedimiento al paciente.
- Rotular un tubo de solución salina isotónica y los medios de cultivo en la parte posterior con el nombre completo del paciente, registro, edad, fecha y hora de toma de muestra.
- Rotular con un lápiz el portaobjetos con el nombre completo del paciente.
- La muestra puede tomarse con el paciente acostado o de pie.
- Introducir el hisopo 3-6 cm realizando movimientos de rotación en la uretra.
- Inocular el agar sangre humana 5%, agar Thayer-Martin y otros medios disponibles, realizar el frotis y sumergir el hisopo en solución salina isotónica estéril.
- Enviar inmediatamente al laboratorio de Microbiología.

Transporte: Enviar en los primeros 15 minutos de la recolección, no exceder de 2 horas y a temperatura ambiente.

6.1.9. OBTENCIÓN DE MUESTRA PARA CULTIVO DE HERIDAS

Recomendaciones:

Limpiar la herida del borde hacia fuera con gasa impregnada con solución yodada para disminuir las probabilidades de contaminación con la flora normal o colonizante.

Técnica de recolección:

- Explicar el procedimiento al paciente.
- Realizar técnica antiséptica desde los bordes hacia afuera de la herida.
- Rotular el tubo con medio de transporte con el nombre completo del paciente, registro, edad, cama (en caso de estar hospitalizado), tipo de muestra y sitioanatómico.
- Tome un hisopado de la herida procurando tomar desde la base donde se origina.
- Insertar el hisopo en el tubo que contiene medio de transporte (rotular el tubo con nomnbre completo, edad, fecha y hora de recolección de muestra)
- Enviar inmediatamente al laboratorio de Microbiología.

Transporte: Enviar en los primeros 15 minutos de la recolección, no exceder de dos horas y a temperatura ambiente.

6.1.10. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SEMEN (ESPERMACULTIVO)

Antes de la recolección: De 48 a 72 horas previas, no mantener relaciones sexuales. Durante las 3 a 5 días previas, no tomar antibióticos.
Para llevar al mínimo la contaminación por microorganismos que están por fuera del meato urinario es necesario obtener lo que se denomina una "muestra limpia", seguir las siguientes instrucciones:

- Rotular el envase donde se deposita la muestra con nombre completo, edad, fecha y hora de recolección.
- Orine y descargue completamente su vejiga.

MINISTERIO DE SALUD DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE Laboratorio de Salud Pública V°B° DIRIS - LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERÚ - DIRIS LIMA ESTE

- Retraer hacia atrás la piel que cubre la cabeza del miembro (prepucio) y limpiar toda la zona superior (meato uretral y glande o "cabeza") con agua y jabón nuevo haciendo movimientos circulares alejándose del orificio, enjuagar con abundante agua. Usar una gasa limpia para secar el exceso de agua.
- Comience a recolectar la muestra de semen por masturbación en el recipiente estéril de boca ancha y tapa rosca (para evitar contaminación, no toque la superficie interna del recipiente). No utilice preservativo, ni cremas, ni lubricantes, etc.
- Entregar la muestra al laboratorio dentro de las 2 horas después de la recolección.

6.1.11. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE LESIONES COMPATIBLES CON MICOSIS SUPERFICIALES

Es necesario elegir el método de toma de muestra de acuerdo a la lesión presentada en el paciente (Ver anexo N° 02).

Indicaciones previas al paciente

- No tomar la muestra cuando el paciente ha recibido tratamiento antimicótico en los últimos 5-10 días, ya que los resultados pueden ser falsamente negativos.
- Higienizar las uñas con un cepillo blando y no deben estar pintadas.
- Limpiar el área afectada con gasa humedicida en alcohol o en agua destilada estéril, con el fin de eliminar el polvo y los contaminantes ambientales depositados en la piel.
- No usar torundas de algodón, ya que las fibras del mismo pueden interferir con el examen directo.

Obtención de la muestra:

A. Cinta adhesiva transparente:

Cortar un fragmento de cinta adhesiva transparente que se debe aplicar con la cara engomada sobre la lesión y se presiona, raspando con el borde lateral de la uña, la superficie de la cinta que cubre la zona afectada para que adhieran las escamas. La cinta se retira obteniéndose asi la impronta de la lesión. A continuación, aplicar la cinta por los extremos sobre una lámina portaobjetos limpia rebatiendo los extremos hacia abajo para que no se despegue. La muestra asi preparada puede ser remitida al laboratorio. Es conveniente tomar dos o tres improntas y montarlas individualmente.

B. Raspado:

Utilizar para todas las lesiones descamativas de la piel, en especial aquellas de gran tamaño. Para obtener el material, raspar el borde activo de la lesión con un bisturí esteril colocado perpendicularmente a la superficie de la piel; si las lesiones son

vesiculosas se remueve el techo de las vesículas con el bisturí; cuando la lesión afecta los pliegues interdigitales el material se toma del borde de las lesiones, junto a la piel sana de los dedos o de la planta del pie, evitando las áreas maceradas.

C. Raspado de uñas:
Si la lesión afecta las uñas, raspar la cara profunda de la superficie afectada, próxima a la región sana de la uña (si la hay), recoger los residuos epidérmicos depositados entre la lámina de las uñas y el lecho subungueal (se elegirán las zonas friables, de color anormal o hiperqueratosicas). Recoger abundante cantidad de material.

6.1.12. MUESTRA PARA EXAMEN PARASITOLÓGICO (HECES)

Consideraciones generales:

- Cuando las heces no se recogen de manera adecuada, los resultados no son confiables.
- Heces viejas y no preservadas no tienen valor diagnóstico.
- Heces refrigeradas no son recomendadas para buscar larvas de helmintos como *Strongyloides stercoralis*.
- Para buscar trofozoítos de protozoos, examinar la muestra dentro de una hora o menos después de evacuada.
- Cuando hay moco y sangre, incluir esta porción, igual que parásitos adultos, segmentos de estróbila de cestodos, otros.
- Evitar antidiarreicos, antibióticos o antiparasitarios antes del examen de heces; no se acepta administración de laxantes aceitosos, bario o bismuto antes de la recolección de la muestra.
- No está definido un límite para el número de veces que el médico solicite una muestra de heces del mismo paciente, puede ser tantas veces hasta estar satisfecho del resultado; por ejemplo, para encontrar larvas de *S. stercoralis*, examinar muestras a intervalos durante un mes; para encontrar quistes o trofozoítos de *Entamoeba histolytica* o de *Giardia lamblia* a veces se requieren hasta 6 muestras recogidas en diferentes días.
- Las muestras de heces para examen parasitológico deben recogerse en frascos de vidrio o plástico, limpios y secos, sin contaminación con agua ni orina. Puede defecarse sobre papel periódico y después transferir una porción de la muestra al frasco de transporte o directamente en una bolsa plástica cuando son heces de 24 horas para recobrar parásitos post tratamiento, cuando hay moco y sangre.
- Si las heces son diarreicas puede defecar en bolsa plástica.

Recolección de la muestra de heces

- Recolectar heces frescas en un frasco de boca ancha, con tapa y correctamente etiquetado con la identificación del paciente (nombre completo, edad, fecha y hora de recolección de muestra).
- Cantidad: 3 - 6 g
- Llevar la muestra al laboratorio en corto tiempo (de 2 - 4 horas de su obtención).

6.1.13 OBTENCION DE MUESTRA SANGUINEA PARA MICROSCOPIA DIRECTA DE MALARIA

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE V°B°

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - DIRIS LIMA ESTE

La muestra de sangre periférica se obtiene para preparar dos clases de películas, una gruesa y una delgada (gota gruesa y frotis), para su examen por microscopía directa.

- Sostener la mano izquierda del paciente, con la palma hacia abajo seleccionar el tercer dedo a partir del pulgar o el dedo índice (El dedo gordo del pie puede ser utilizado en niños).
- Limpiar el dedo con una pieza o torunda de algodón ligeramente humedecido en alcohol, utilizando golpes firmes para retirar suciedad y grasa de la yema del dedo.
- Secar el dedo con un algodón limpio y seco, utilizando golpes firmes para estimular la circulación de la sangre.
- Sostener el dedo del paciente con la mano izquierda, tomándolo por sus lados y manteniendo una suave presión sobre ellos para favorecer la salida de sangre.
- Punzar el borde de la yema del dedo con una lanceta estéril y un movimiento rápido, presionar suavemente el dedo para extraer la primera gota de sangre y limpiar con una torunda de algodón seco. Asegúrese que ninguna hilacha de algodón, que pueda mezclarse posteriormente con la sangre.
- Aplicar suave presión al dedo para extraer una gota de sangre y colocarla inmediatamente en contacto con el primer tercio externo de la superficie de la lámina. El tamaño de esta gota se aproxima al tamaño de una cabeza de fósforo.
- Presionar nuevamente el dedo y colectar una segunda gota de sangre más pequeña que la primera, en el centro de la lámina, para realizar el frotis.
- Limpiar la sangre restante del dedo con una torunda de algodón humedecido en alcohol e indicar al paciente que presione esta torunda contra el lugar de la punción por 5 minutos.
- Una vez obtenida la muestra:
  - ❖ Realizar la gota gruesa de la siguiente manera: utilizando uno de los ángulos de una segunda lámina (lámina auxiliar) esparcir rápidamente la gota de sangre y extenderla uniformemente hasta formar una gota gruesa de 1 cm de lado o de diámetro. La sangre no debe ser excesivamente revuelta, es suficiente con 3 a 6 movimientos. De preferencia, realizar el homogeneizado de la muestra en una sola dirección, en forma concéntrica (de adentro hacia fuera o viceversa).
  - ❖ Realizar el frotis: Utilizando la misma lámina auxiliar, ponerla en contacto con la superficie de la lámina que contiene la gota central y hacerla correr firmemente a lo largo de su borde en un ángulo de 45°. Asegúrese de que ocurra un contacto parejo con la superficie de la lámina todo el tiempo que la sangre esté siendo esparcida, de tal manera que el frotis sea homogéneo y fino. Siempre manipular las láminas por los bordes o por una esquina para realizar el frotis.
- Rotular las láminas con nombre completo del paciente, dejar secar la lámina para luego ser teñida y analizada.

6.1.14 OBTENCION DE FROTIS SANGUINEO PARA DIAGNOSTICO DIRECTO DE BARTONELOSIS.

- La muestra de sangre periférica se obtiene para preparar un frotis sanguíneo.

MINISTERIO DE SALUD Laboratorio de Salud Pública DIRIS - LIMA ESTE V°B°

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE

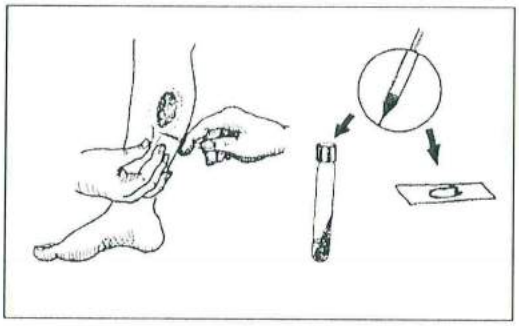
- Obtener muestras de sangre venosa siguiendo el procedmiento en el Manual de Procedimientos de Laborartorio, 2013 – capitulo III.
- Realizar el frotis sanguineo: Utilizando la misma lámina auxiliar, ponerla en contacto con la superficie de la lámina que contiene la gota central y hacerla correr firmemente a lo largo de su borde en un ángulo de 45°. Asegúrese de que ocurra un contacto parejo con la superficie de la lámina todo el tiempo que la sangre esté siendo esparcida, de tal manera que el frotis sea homogéneo y fino. Siempre manipular las láminas por los bordes o por una esquina para realizar el frotis.
- Rotular las láminas en el cabeza del frotis con nombre completo del paciente, dejar secar la lámina para luego ser teñida y analizada.

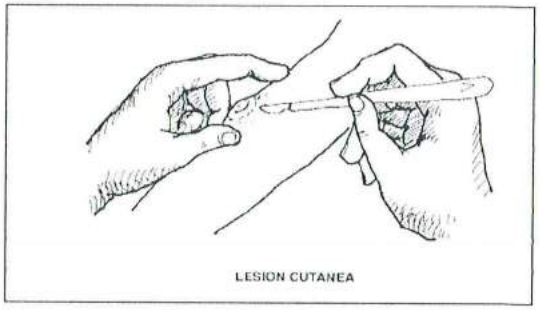
6.1.15 OBTENCION DE FROTIS DE LESION PARA DIAGNOSTICO DIRECTO DE LEISHMANIASIS.

Consiste en el reconocimiento de los parasitos en forma de amastigotes. Se realiza un frotis con material tomado de los bordes dérmicos de las lesiones cutáneas.

Obtención:

- Lavar la lesión con agua y jabón.
- Desinfectar con alcohol 70% los bordes de la lesión.
- Presionar con firmeza los brodes de la lesión hasta que empalidezca; en el borde interno, hacer una pequeña incisión con hoja de bisturí tratando de levantar la piel, secar la sangre con gasa y raspar el tejido.
- Con el material obtenido en la hoja de bisturí, hacer el frotis en una lámina, procurando que sea delgado y evitando pasar dos veces por el mismo sitio.
- Rotular la lámina y dejar secar a medio ambiente.
- El frotis se puede realizar con líquido tisular obtenido con pipeta, con material de biopsia o con material procedente del raspado de mucosas.
- Fijar el frotis con alcohol metílico durante 3 minutos y dejar secar a temperatura ambiente.





6.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO

6.2.1 RECEPCION

- Asignar a cada muestra unitaria un número individual (Unidad de Recepción de muestras).
- Verificar los datos de la muestra con los datos que figuran en el petitorio de análisis y registrar físicamente en el REGISTRO DE MUESTRAS CULTIVOS BACTERIOLOGICOS del Laboratorio de Microbiologia clínica y de manera virtual en el Software WHONET instalado en la computadora del área (Solo para cultivos bacteriológicos); y en el caso de exámenes parasitológicos y micóticos, registrar la muestra en el cuaderno de registro de análisis.
- Examinar el contenedor de muestra para comprobar que no presentan contaminación cruzada proveniente de los defectos descritos anteriormente y que invalidaría el análisis.
- Tan pronto como la muestra llega al laboratorio, anotar las condiciones físicas generales de la misma.
- Si es posible, examinar las muestras dentro de las 6 horas de recibirlas.

6.2.2 MANIPULACION

- Usar los implementos de bioseguridad.
- Antes de manipular o analizar las muestras, limpiar las áreas de trabajo y áreas circundantes con un agente germicida comercial.
- El análisis microbiológico de la muestra, realizarlos tan pronto como sea posible después de la recolección para evitar cambios impredecibles en la población microbiana (bacterias, hongos o parásitos).

VII. RESPONSABILIDADES

- La Dirección de Monitoreo y Gestión Sanitaria es la responsable de supervisar el cumplimiento del presente manual; además, debe gestionar la provisión de insumos, equipos necesarios para la adecuada aplicación de las disposiciones contenidas en el presente manual.

- El Laboratorio Referencial de Salud Pública, es la responsable de monitorizar el cumplimiento de los procedimientos contemplados en el presente manual.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnóstico microbiológico. 3a ed., Buenos Aires.

- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999.

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método disco difusión, Serie de normas tecnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.
- Manual de Procedimientos de laboratorio: Laboratorios locales I, laboratorios locales II. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2013.
- Manual de Procedimientos de Laboratorio para la Obtención y Envío de Muestras. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N.° 15.
- Manual de Procedimientos y Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico de Micosis Oportunistas y Profundas. Lima: INS; 1997. Serie de Normas Técnicas N° 23.
- Manual de Procedimientos y técnicas de Laboratorio para la Identificación de Principales Hongos Oportunistas Causantes de Micosis Humanas. Lima:INS; 2007. Serie de Normas Técnicas N.° 44.
- Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas. 3ra. Edición. 2003.
- Beltrán Fabián de Estrada, María. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de los parásitos Intestinales del hombre. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2013.
- Ventura Egúsquiza, Gladis; Padilla Rojas, Carlos P. Diagnóstico bacteriológico de la Bartonelosis humana o enfermedad de Carrión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2006.
- Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnostico de Leishmaniasis. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2006.
- Gutierrez Gonzáles, Sonia C. y Arróspide Velasco, Nancy. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2003

IX. LISTA DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS

- Coloración Gram
- Siembra primaria para cultivo de orina (Urocultivo)
- Siembra primaria de muestra sospechosa de *Neisseria gonorrhoeae*
- Siembra primaria de heces (coprocultivo)
- Siembra primaria de muestra de secreción faríngea
- Siembra primaria de muestra de secreción vaginal
- Siembra primaria de heridas
- Siembra primaria de semen (espermacultivo)

- Identificación de cocos gram positivos: Genero Staphylococcus
- Identificación de cocos gram positivos: Género Enterococcus
- Identificación de cocos gram positivos: Genero Streptococcus
- Identificación de cocos gram negativos: Genero Neisseria
- Identificación de cocos gram negativos: Genero Moraxella
- Identificación de cocobacilos gram negativos: Genero Haemophilus
- Identificación de cocobacilos gram negativos gram variables: Genero Gardnerella
- Identificación de bacilos gram negativos: genero Campylobacter
- Identificación de bacilos gram negativos: Genero Aeromonas
- Identificación de bacilos gram negativos: Genero Plesiomonas
- Identificación de bacilos gram negativos: Genero Pseudomonas
- Identificación de bacilos gram negativos: Genero Enterobacteriaceae
- Identificación de bacilos gram negativos: Genero Brucella
- Preparación del agar Mueller Hinton para prueba de sensibilidad método Kirby Bauer
- Prueba de sensibilidad: Método Kirby Bauer (disco difusión)
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para *Staphylococcus spp*
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para *Enterococcus spp*
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para *Pseudomonas aeruginosa*
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para genero Enterobacteriaceae
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para *Salmonella spp.* y *Shiguella spp*
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para genero Vibri
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para *Streptococcus pneumoniae* (neumococo)
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para *Streptococcus spp* (excepto neumococo)
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para *Haemophylus spp*
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para *Acinetobacter spp.*
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE V°B°

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE

- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para detección de AmpC mediada por plásmido.
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para detección de AmpC mediada por plásmido (test tridimensional)
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para detección de carbapenemasas "Test de Hodge modificado"
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para detección de metalobetalactamasas.
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para detección de resistencia inducible a Clindamicina.
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para para detección de resistencia a penicilina en *Staphylococcus spp.*
- Prueba de sensibilidad método Kirby Bauer (disco difusión) para para detección de resistencia a Oxacilina.
- Identificación de *Candida albicans.*
- Examen directo con Hidróxido de potasio al 10%
- Cultivo de hongos.
- Examen parasitológico directo.
- Examen parasitológico método de concentración.
- Busqueda de huevos de *Enterobius vermicularis*
- Coloracion giemsa para diagnostico directo en frotis y gota gruesa

TITULO: COLORACION GRAM		
POE N°: 01	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir el procedimiento a seguir para realizar la coloración Gram en muestras biológicas que lo requieran.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Muestras biológicas.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Asas de siembra (nicrón)
- Encendedor
- Guantes de látex
- Láminas portaobjetos
- Mechero Bunsen
- Soporte para coloración.
- Microscopio compuesto, binocular, con lentes objetivo de 10X, 40X y 100X.
- Reactivos: Colorante cristal violeta, colorante Safranina, Alcohol acetona y lugol.

V. PROCEDIMIENTO

- Realizar un extendido fino de la muestra en estudio o de colonias bacterianas aisladas; dejar secar y fijar el extendido al calor.
- Cubrir la superficie del extendido con cristal violeta durante un minuto.
- Lavar con agua corriente y eliminar el exceso de agua.
- Cubrir la superficie del extendido con lugol durante un minuto.
- Lavar con agua corriente y eliminar el exceso.
- Cubrir la lámina con alcohol acetona durante 10 segundos aproximadamente.
- Lavar con agua corriente y eliminar el exceso de agua.
- Cubrir la superficie del extendido con safranina durante 15 segundos.
- Lavar con agua corriente y eliminar el exceso de agua.
- Dejar secar.

VI. INTERPRETACIÓN

Realizar la lectura con un aumento de 100X en el microscopio.

Bacterias Gram Positivas = toman una coloración azul – violeta

Bacterias Gram Negativas = toman una coloración rosa – rojo

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

TITULO: COLORACION GRAM		
POE N° : 01	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

VII. REPORTE DE RESULTADOS

- Reportar la respuesta leucocitaria: su tipo (polimorfo nucleares o mononucleares) y su cantidad (escasos, regular o abundante).
- Reportar la presencia de bacterias:
  - Forma de la bacteria (coco, cocobacilo, bacilo).
  - Asociación bacteriana (tétradas, racimo, cadena),
  - Tipo de reacción con el colorante (Gram positivo o negativo),
  - Asociación con las células (intracelulares) y su cantidad (escasos, regular o abundantes).

REFERENCIAS

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnóstico microbiológico. 3a ed., Buenos Aires.
- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999.

REDACCION

Lic. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA PARA CULTIVO DE ORINA (UROCULTIVO)		
POE N°: 02	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 5

I. OBJETIVO

Aislamiento de gérmenes patógenos causantes de infección urinaria.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Muestra de orina en condiciones adecuadas para el cultivo.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Asa calibrada de nicrón, platino o descartable estéril de 1 ul para detección de recuento de colonias mayores de 1,000 UFC/ml y asa de 10 ul para la detección de recuento de colonias entre 100 y 1,000 UFC/mL.
- Estufa de 35 – 37 °C.
- Mechero Bunsen o Cabina de bioseguridad de tipo II clase A.
- Guantes de látex.
- Contenedor de material contaminado o Envase con lejía 10%.
- Pinza estéril.
- Medios de cultivo: Placas con agar sangre de carnero, placas con agar Mc Conkey y otros medios que permitan la detección de los uropatógenos más comunes, a su vez infecciones mixtas y hongos.
- Coloración de Gram (Cristal violeta, lugol de Gram, alcohol acetona y Safranina).
- Método de la micropipeta (solo en caso de no contar con asa calibrada): Usar una micropipeta calibrada de 1 a 10 uL con puntas de pipetas estériles

V. PROCEDIMIENTO

Examen directo:

- Colocar 10 ul de orina bien mezclada sin centrifugar sobre una lámina portaobjetos, colocar un cubreobjetos y observar a 40X
- La presencia de más de 5 leucocitos por campo es considerada como indicativo de piuria.
- La presencia de muchas células epiteliales y morfotipos microbianos diferentes sugieren contaminación.

Coloración Gram: La tinción de Gram es útil para determinar rápidamente el tipo y el recuento de bacterias y células en la orina.

- Colocar 10 ul de orina bien mezclada sin centrifugar sobre una lámina portaobjetos, y deje que se seque al aire sin extenderla.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD DIRIS - LIMA ESTE V°B°

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA PARA CULTIVO DE ORINA (UROCULTIVO)		
POE N°: 02	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 5

- Realizar la coloración Gram.
- Leer la lámina coloreada, determinar el número de organismos por campo de aceite de inmersión. Un organismo observado a 100X correlaciona con un recuento de colonias de 10^5/ml de orina.

Detección de actividad antimicrobiana residual en cultivo de orina:

- Preparar *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a la escala de 0.5 McFarland.
- Hisopar la suspensión bacteriana sobre una placa de agar Mueller Hinton.
- Dividir la placa en cuadriculas y enumerar cada una de acuerdo al número de orina que se inoculará.
- Colocar 10 uL de orina sobre un disco de papel filtro colocado previamente en la placa (método difusión en papel impregnado) o inocular directamente 1 uL de orina con el asa de siembra sobre la placa de agar de Mueller Hinton (método inoculación directa).
- Incubar a 37 °C por 24 horas.

Cultivo: Asa de 10 uL (1 colonia = 100 UFC/mL) y 1 uL (1 colonia = 1000 UFC/mL).

Método del asa calibrada

- Rotular las placas de Agar sangre, Mc Conkey que se utilizarán, estas placas deben estar a temperatura ambiente.
- Tomar el frasco con la muestra de orina, mover suavemente, abrir la tapa y flamear la boca del frasco en el mechero Bunsen.
- Usando un asa calibrada flameada y enfriada o una descartable, mantener el asa verticalmente, y sumergir solamente el aro por debajo de la superficie de la muestra de orina, sin centrifugar y bien mezclada.
- Llevar una asada de la orina bien mezclada sobre la placa de agar sangre haciendo una línea recta a lo largo y por el centro del agar y estriar la orina mediante una serie de pases en ángulos de 90° a través del inóculo.
- Para el aislamiento de colonias usar Agar McConkey, proceder de la misma forma siguiendo el procedimiento anterior.
- Cuando se utilizan 10 ul, de muestra tomar una asada de orina bien mezclada para inocular y estriar en cuadrantes las placas de agar.
- Cerrar la placa y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
- Una vez sembradas las placas, incubar durante 16 a 18 horas a 35 - 37° C, ambiente aeróbico. Incube 48 horas aquellos urocultivos negativos con sedimento urinario alterado y sembrar en Agar Sangre con estría.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE Laboratorio de Salud Pública V°B° DIRIS - LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD REPÚBLICA DEL PERÚ Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria DIRIS LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA PARA CULTIVO DE ORINA (UROCULTIVO)		
POE N°: 02	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 5

- Si es conveniente, incubar el Agar Sangre en 5% de CO2 para mejorar el desarrollo de los organismos gram-positivos y bacterias dependientes de CO2.

VI. LECTURA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Examinar los cultivos que han sido incubados durante toda la noche, pero hacer la lectura final a las 24 hrs. En los siguientes casos se debe incubar el cultivo hasta por 48 horas:

- La muestra ha sido obtenida por una técnica invasiva.
- Pequeñas o pocas colonias que hacen una lectura discernible.
- Los resultados no correlacionan con la tinción gram o la sintomatología clínica (ejm: piuria o con sintomatología y cultivo negativo).
- Paciente inmunosuprimido, incluye pacientes que han sido transplantados.
- Se requiere cultivo para hongos o levaduras (ejm: cultivos de UCI neonatal).

Detección de la actividad antimicrobiana residual: La observación de un halo inhibición alrededor del disco o de la punción directa se consideró como presencia de actividad antimicrobiana residual en la muestra de orina.

Urocultivo positivo

Para los cultivos positivos, examinar los medios de cultivo para la cuantificación y tipo morfológico de los organismos presentes.

0.001 mL 1 colonia = 1000 UFC/ml
0.01 mL 1 colonia = 100 UFC/ml

Cuando las colonias son demasiado numerosas para contar:

El máximo recuento usando el asa de 1 ul es >105 UFC/ ml.
El máximo recuento usando el asa de 10 ul es >104 UFC/ml.

VII. CONSIDERACIONES

- *Streptococcus agalactiae* debe ser reportado de mujeres en edad fértil y de diabéticos conocidos, independientemente del recuento.
- Mantenga las muestras de orina en refrigeración por lo menos 24 horas para resolver cualquier problema con la muestra o resultados del cultivo.
- No informar recuento en levaduras.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE V°B°

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA PARA CULTIVO DE ORINA (UROCULTIVO)		
POE N°: 02	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 4 de 5

VIII. REPORTE DE RESULTADO

a) Reportar de la Tinción Gram: resultados de bacterias y células.
b) Cultivos Negativos:
Reportar: de acuerdo al asa calibrada utilizada.

Negativo dil 1/100 UFC/ml ó
Negativo dil 1/1000 UFC/ml. por 24 o 48 horas

Si solamente se observa microbiota urogenital o de la piel, reportar como cultivo negativo y el recuento será de "10,000 UFC/ml de microbiota urogenital normal.

c) Cultivos positivos, reportar:

- Los cultivos mixtos son reportados con el recuento en UFC/ml, seguido por "múltiple morfotipos bacterianos presente" (Polimicrobismo); posible contaminación; se sugiere nueva muestra, con pronto envío al laboratorio, si está clínicamente indicado."
- Reportar el recuento de colonias de cada patógeno por separado, seguida por la identificación presuntiva, mínima, o definitiva y resultados de la prueba de susceptibilidad.
- Cuando se observa inhibición por antimicrobianos, reportar: Se detectó inhibidor antimicrobiano con su recuento respectivo.
- Mantener copia de los resultados en sistema manual o electrónico.

IX. INTERPRETACION

El criterio de >/= 10^5 UFC/ml para significancia puede ser aplicado a la mayoría de las muestras enviados para cultivo. Sin embargo, lo siguiente será cierto:

- En pacientes sin sonda vesical, la cuenta significativa de bacterias en orina es la presencia de más de 105 UFC/mL de un solo germen.
- Un cultivo mixto en un paciente ambulatorio no complicado probablemente indica contaminación.
- Recuentos menores (<10^4/ml) de bacterias comúnmente encontrados sobre la piel y genital interno y externo son considerados ser contaminantes, pero en circunstancias especiales, un recuento de Enterobacteriaceae de 10^2 UFC/ml o más, pueden ser considerado significativo.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE V°B°

MINISTERIO DE SALUD REPUBLICA DEL PERU DIRIS LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA PARA CULTIVO DE ORINA (UROCULTIVO)		
POE N°: 02	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 5 de 5

REFERENCIAS

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnóstico microbiológico. 3a ed., Buenos Aires.
- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999.
- Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario, Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(1):52–57.
- M. Torres, A. Mattera. Infección urinaria. Revista. México: UNAM, Microbiología; 2006 Abril.
- Stephanie Braun J. Recomendaciones para el diagnóstico microbiológico de la infección urinaria. Revista. CHILE: COMITE DE MICROBIOLOGIA CLINICA. SOCIEDAD CHILENA DE INFECTOLOGIA*, Laboratorio de Microbiología Universidad Católica de Chile; 2001. Report No.: 562.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE V°B°

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE

TITULO: AISLAMIENTO PRIMARIO DE MUESTRAS SOSPECHOSAS DE *Neisseria gonorrhoeae*		
POE N°: 03	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar el aislamiento del agente, mediante el cultivo de secreciones o hisopados de pacientes con sospecha de infección por *Neisseria gonorrhoeae*.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Secreciones o hisopados de pacientes con sospecha de infección por *Neisseria gonorrhoeae*, en condiciones adecuadas para el cultivo.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agar Thayer-Martin modificado (ATMM)
- Agar chocolate enriquecido (ACH)
- Reactivo de oxidasa.
- Placas Petri
- Tubos de ensayo de vidrio
- Asas de siembra
- Estufa a 35°C – 37°C
- Microscopio compuesto, binocular, con lentes objetivo de 10X, 40X y 100X
- Autoclave
- Jarra de cierre hermético tipo GasPak System o jarra de anaerobiosis.

V. PROCEDIMIENTO

1. Preparar dos frotices tan finos como sean posibles y que abarquen una buena extensión en la lámina porta-objeto (limpia, desengrasada, no rayada). Para evitar alteraciones de la morfología celular, no debe frotarse vigorosamente en el caso de hisopado, ésta se debe rotar suavemente sobre la superficie de la lámina porta-objetos. Deje secar la muestra a temperatura ambiente o a calor suave, para luego realizar la coloración de Gram.
2. Inocular el hisopado de la muestra en una placa conteniendo agar chocolate y luego en medio ATMM, haciendo girar el hisopo sobre el medio, más o menos la cuarta parte del borde superior.
3. Con ayuda de un asa bacteriológica, diseminar la muestra por todo el medio, por estriamiento. La siembra en agar chocolate debe ser más estricta que en el medio de cultivo Thayer-Martin.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE Laboratorio de Salud Pública V°B° DIRIS - LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD REPUBLICA DEL PERU Dirección Ejecutiva de Mantenimiento y Gestión Hospitalaria DIRIS LIMA ESTE

TITULO: AISLAMIENTO PRIMARIO DE MUESTRAS SOSPECHOSAS DE *Neisseria gonorrhoeae*		
POE N°: 03	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

4. Incubar las placas sembradas, casi de inmediato, a 35°C-37°C en un ambiente que contenga 3 a 7% de CO2 y 50-70% de humedad. Las placas sembradas no deben de permanecer por más de 4 horas sin incubación.

VI. INTERPRETACION

1. Positivo: Si se observa la presencia de diplococos intracelulares Gram negativos típicos (ovales, de formas arriñonadas agrupados en pares)
2. Sospechoso: Si sólo se observan diplococos Gram negativos extracelulares en la coloración GRAM.
3. Las colonias primarias de *N. gonorrhoeae* que desarrollen en medio Thayer-Martin y/o agar chocolate enriquecido, después de 18-24 horas. de incubación, tienen un tamaño de 1-2 mm. de diámetro, son ligeramente levantadas, lobulares, traslúcidas y, generalmente, mucoides
4. Negativo: Si no se observan diplococos Gram negativos a las 72 horas.

REFERENCIAS

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnóstico microbiológico. 3a ed., Buenos Aires.
- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999.
-

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD DIRIS - LIMA ESTE V°B°

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE HECES (COPROCULTIVO)		
POE N°: 04	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 4

I. OBJETIVO

Realizar el aislamiento de agentes, mediante el cultivo de muestras de heces y/o hisopados rectales de pacientes con sospecha de infección por bacterias enteropatógenas.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L. E.

III. MUESTRA

Heces de pacientes con sospecha de infección por bacterias enteropatógenas, en condiciones adecuadas para el cultivo.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Medio de transporte Cary Blair.
- Caldo de enriquecimiento: Caldo Selenito, Agua Peptonada Alcalina.
- Agar Mac Conkey con Sorbitol., Agar XLD, Agar SS, Agar Campy, Agar TCBS
- Medios diferenciales: TSI, LIA, SIM, Citrato de Simmons.
- Reactivo de Oxidasa, Indol, Catalasa.
- Placas petri, tubos de ensayo de vidrio
- Asas de siembra (nicrón)
- Estufa a 35°C – 37°C
- Jarra de cierre hermético tipo GasPak System o jarra de anaerobiosis.
- Laminas portaobjetos y cubreobjetos.

V. PROCEDIMIENTO

Antes de la siembra primaria:

- Sembrar la muestra inmediatamente.
- Preparar una lámina con azul de metileno y suero fisiológico para la Reacción Inflamatoria.
- Hacer un extendido delgado y homogéneo sobre una lámina portaobjeto, para su posterior coloración de vago o Gram interrumpido.

Siembra en medios primarios

- Verificar que las superficies de los medios de cultivo a utilizar se encuentren completamente secos antes de realizar la siembra.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - Laboratorio de Referencia Regional de Salud Pública - V°B°

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE HECES (COPROCULTIVO)		
POE N°: 04	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 4

- Tomar con la ayuda de un hisopo, un inoculo de la muestra fresca de aquella porción que presente un aspecto patológico (moco, sangre, etc.) o una muestra a partir del medio Cary Blair, y colocar el inoculo en un extremo de la placa mediante un rodamiento en los medios selectivos:
  - ✓ Agar XLD, sembrar por estría-agotamiento e incubar por 18-24 horas a 35 - 37°C.
  - ✓ Agar Salmonella-Shigella, sembrar por estría-agotamiento e incubar por 18-24 horas a 35 - 37°C.
  - ✓ Agar Mac Conkey Sorbitol, sembrar por estría-agotamiento e incubar por 18-24 horas a 35 - 37°C.
  - ✓ Agar TCBS, sembrar por estría-agotamiento e incubar por 18-24 horas a 35-37°C.
  - ✓ Agar Selectivo para Campylobacter (Butzler) / Filtración, sembrar por el método de palmera (esterilla) e incubar a 42°C por 48 horas, en microaerofilia.
- Caldo Selenito F, inocular aprox. una asada de la muestra e incubar por 18-24 horas a 35-37°C. A partir de medio de enriquecimiento, Caldo Selenito F, sembrar por estria-agotamiento en Agar Salmonella-Shigella e incubar a 37°C por 24 horas.

En caso de no procesar la muestra inmediatamente, inocular con un hisopo en un tubo con Cary-Blair y refrigerarla hasta su procesamiento.

Siembra en medios de enriquecimiento

1. Colocar los hisopos utilizados en la siembra primaria en los caldos de enriquecimiento (caldo selenito y agua peptonada).
2. Colocar los medios sembrados en la estufa.
3. Incubar por 18 – 24 horas a 37°C.

Siembra a partir de medios de enriquecimiento

1. Tomar una asada sin agitar del caldo de selenito.
2. Sembrar por agotamiento en el agar SS
3. Tomar una asada sin agitar del agua peptonada
4. Sembrar por agotamiento en el agar TCBS
5. Colocar los medios sembrados en la estufa.
6. Incubar por 18 – 24 horas a 37°C.

Identificación bioquímica

Las colonias sospechosas en las placas de siembra directa y las de enriquecimiento, excepto las colonias que provengan de medios selectivos para Campylobacter, se inoculan en los medios diferenciales (identificación bioquímica) según el orden y como se indica a continuación (Los medios de cultivo deben estar a temperatura ambiente antes de sembrar):

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE HECES (COPROCULTIVO)		
POE N°: 04	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 4

1) Citrato de Simmon's: Medio de color verde, pH 6.8, sembrar por estría sobre la superficie inclinada del medio. Incubar a 35-37 °C por 18-24 horas.
2) Triple Azúcar Hierro (TSI): Medio de color rojo ladrillo, pH 7.4, sembrar por puntura y estría, introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, terminando en estría en la superficie inclinada. Incubar a 35-37 °C por 18-24 horas.
3) Agar Lisina Hierro (LIA): Medio de color lila, pH 6.7, sembrar por doble puntura y estría, introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo dos veces, terminando en estría en la superficie inclinada.
4) Sulfuro Indol para movilidad (SIM): Medio semisólido de color amarillo, sembrar por puntura hasta el fondo del tubo. Incubar a 35-37 °C por 18-24 horas.
5) Agar Urea de Christensen's: medio de color amarillo claro, pH 6.8, sembrar por estría sobre la superficie inclinada. Incubar a 35-37 °C por 18-24 horas.

VI. INTERPRETACION

1. **Agar XLD:**
   - Salmonella: Colonias rojas a veces con punto negro, amarillos con punto negro o completamente negras;
   - Shigella: Colonias rojas;
   - E coli: Colonias Amarillas.
2. **Agar SS**:
   - Salmonella: Colonias translucidas e incoloras, algunas se presentan con bordes incoloras y en el centro negro;
   - Shigella: Colonias translucidas e incoloras;
   - E coli: colonias rojas.
3. **Agar Mac Conkey**:
   - *Salmonella* y Shigella: Colonias translucidas e incoloras;
   - *E. coli*: colonias rojas.
4. **Agar Mac Conkey con sorbitol**:
   - *E. coli* O 157 se presentan como colonias pequeñas, incoloras (no fermetan sorbitol).
5. **Agar TCBS:**
   - *V. cholerae*: Colonias color amarillo, redondas, cremosas, ligeramente convexas de 2-4mm de diámetro aproximadamente;
   - *V. parahemoliticus*: colonias verdes azuladas.
6. **Agar Campy:**
   - Se observan colonias planas, no hemolíticas de aspecto acuoso, grisáceas, con bordes irregulares y con tendencia a diseminarse, muchas veces se pueden ver incoloras.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE HECES (COPROCULTIVO)		
POE N°: 04	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 4 de 4

VII. REPORTE DE RESULTADOS

Registrar los resultados del cultivo en la hoja de trabajo:

Cultivo positivo: "Identificación del microorganismo y prueba de sensibilidad".

Cultivo negativo: "Cultivo negativo para enteropatógenos".

REFERENCIAS:

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnóstico microbiológico. 3a ed., Buenos Aires.
- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999.

REDACCION:

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECION FARINGEA		
POE N°: 05	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar el aislamiento de agentes, mediante el cultivo de muestras de secreción faríngea de pacientes con sospecha de infección bacteriana.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Secreción faríngea de pacientes con sospecha de infección bacteriana, en condiciones adecuadas para el cultivo.

IV. CONSIDERACIONES GENERALES

- Se considera como patógenas en secreción faríngea a las siguientes bacterias: *Streptococcus pyogenes* y otros Streptococos beta hemolíticos.
- En un paciente inmunosuprimido, con tratamiento antibiótico, la flora normal puede estar alterada, la presencia de Pseudomonas y hongos debe ser reportada.
- Se considera flora normal la presencia de *Streptococcus viridans*, Streptococos gamma hemolítico, bacilos difteriodes, *H. influenzae, S. pneumonia*, enterobacterias y bacilos negativos no fermentadores cuando su crecimiento no sea mayor de 2+

V. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Muestra de secreción faríngea obtenida con hisopo colocada en un tubo de ensayo con 1 ml de suero fisiológico estéril.
- Mechero Bunsen, asas de siembra.
- Guantes de látex, mascarilla
- Estufa de 35 – 37 °C
- Contenedor de material contaminado.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero Agar Chocolate enriquecido o Thayer Martin, Agar Mac Conkey, Agar Manitol Salado y otros medios que tengan disponibles.
- Jarra de microaerofilia.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Realizar un frotis directo de la muestra de secreción bronquial y realizar la coloración Gram.
2. Inocular con la ayuda del hisopo, la muestra por rodamiento de éste en un extremo de la placa de Agar sangre de carnero, agar chocolate enriquecido o Thayer Martin, agar manitol salado, agar Mac Conkey.
3. Sembrar por agotamiento.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECION FARINGEA		
POE N°: 05	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

4. Las placas de agar sangre y agar chocolate enriquecido o Thayer Martin sembrarlas en microaerofilia a 37°C y las placas de Mac Conkey y Manitol salado incubarlas a 37°C durante 18-24 horas.

VII. INTERPRETACION

- Buscar la presencia de colonias betahemoliticas compatibles con *Streptococcus pyogenes* u otros *Streptococcus* betahemoliticos.
- El desarrollo de colonias cocos gram positivos, bacilos, cocobacilos, diplococos gram negativos justifica realizar su identificación.
- Realizar el seguimiento a Streptococos, Staphylococos, Hemophilus, Enterobacterias, Pseudomonas, etc.
- El no desarrollo de colonias a las 72 horas se reporta como CULTIVO NEGATIVO.
- Realizar la identificación bioquímica y prueba de sensibilidad.

VIII. REPORTE DE RESULTADOS

Cultivo positivo: Identificación del microorganismo y prueba de sensibilidad
Cultivo negativo: Cultivo negativo.

REFERENCIAS

- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, Garcia L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECION VAGINAL		
POE N°: 06	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar el aislamiento de agentes, mediante el cultivo de muestras de secreción vaginal de pacientes con sospecha de infección bacteriana.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Secreción vaginal de pacientes con sospecha de infección bacteriana, en condiciones adecuadas para el cultivo.

IV. CONSIDERACIONES GENERALES

- El flujo vaginal anormal puede deberse a:
  - ❖ Vaginitis: *Gardnerella vaginalis, Candida albicans.*
  - ❖ Vaginosis bacteriana: Crecimiento excesivo de anaerobios y *Mobiluncus spp.*
  - ❖ Cervicitis: *Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis.*
- La flora vaginal de las mujeres pre menopaúsicas consiste normalmente en una predominancia de lactobacilos y de una amplia variedad de bacterias aerobias y anaerobias facultativas.

V. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Muestra de secreción vaginal obtenida con hisopo colocada en un tubo de ensayo con 1 ml de suero fisiológico estéril.
- Mechero Bunsen
- Guantes de látex, mascarilla,
- Estufa de 35 – 37 °C
- Contenedor de material contaminado.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), Agar Chocolate, Agar Mac Conkey, Agar Manitol Salado, Agar Sabouraud dextrosa y otros medios que tenga disponible.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Observar la muestra directa con solución salina estéril y buscar la presencia de células leucocitarias, hematíes, levaduras, Trichomonas y otras estructuras.
2. Realizar una coloración Gram y buscar la presencia de flora Doderlein y células clave.
3. Agregar en una lámina una gota de KOH al 10% + la muestra (Test de aminas - prueba para *Garnerella vaginalis*).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SECRECION VAGINAL		
POE N°: 06	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

4. Colocar el inoculo en un extremo de la placa de agar sangre, chocolate enriquecido o Thayer Martin, agar Mac Conkey, agar manitol salado y agar Sabouraud dextrosa y sembrar por agotamiento.
5. Las placas de agar sangre y chocolate sembrarlas en microaerofilia a 37°C y las placas de Mac Conkey y Sabouraud incubarlas a 37°C durante 18-24 horas.

VII. INTERPRETACION

1. El desarrollo de cocos, cocobacilos, bacilos gram negativos, cocos, cocobacilos gram positivos justifica su identificación.
2. Realizar el seguimiento a Streptococos, Staphylococos, Garnerella, Enterobacterias, Pseudomonas, levaduras, etc.
3. Si no hay desarrollo a las 72 horas reportar como CULTIVO NEGATIVO.
4. Realizar prueba de sensibilidad para colonias patógenas.

VIII. REPORTE DE RESULTADOS

Registrar: Examen directo y coloración Gram

1. Cultivo positivo: identificación del microorganismo y prueba de sensibilidad.
2. Cultivo negativo: Cultivo negativo.

REFERENCIAS

• Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnóstico microbiológico. 3a ed., Buenos Aires.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HERIDAS		
POE N°: 07	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Aislar Bacterias patógenas que causan infecciones en heridas.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Muestra de heridas de pacientes con sospecha de infección bacteriana, en condiciones adecuadas para el cultivo.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Estufa de 35 – 37 °C.
- Cabina de flujo laminar o mechero Bunsen.
- Guantes de látex.
- Contenedor de material contaminado.
- Medios de cultivo: (Agar sangre de carnero, Agar Mc Conkey, Manitol salado, Agar Chocolate).

V. PROCEDIMIENTO

1. Cuando la muestra es purulenta con una pipeta Pasteur inocular una gota de la muestra en un extremo de la superficie de la placa de agar de sangre de carnero, agar Mc Conkey, manitol salado, agar chocolate.
2. Cuando la muestra es un hisopado de secreción: Frotar rotando el hisopo sobre la superficie de los medios de cultivo tratando que toda su superficie haga contacto con el agar, empezando con el agar sangre de carnero, Mc Conkey, agar manitol salado, agar chocolate.
3. Realizar un frotis y posteriormente colorearlo con la coloración GRAM.
4. Esterilizar el asa de siembra en el mechero de Bunsen hasta que se ponga rojo vivo, dejar enfriar el asa.
5. Utilizando el asa de siembra y tomando como referencia central el inóculo de la muestra, realizar la siembra por dispersión agotamiento en cuatro cuadrantes de la placa con el propósito de obtener colonias aisladas.
6. Incubar las placas de Agar sangre a 35 °C en microaerofilia por 24 horas y el agar Mc Conkey en condiciones aeróbicas por 24 horas.
7. Concluida la siembra, cerrar las placas y colocarla con la parte que tiene el medio de cultivo hacia arriba.
8. Incubar las placas a 35 – 37 °C por 24 – 48 horas.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE HERIDAS		
POE N°: 07	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

VI. INTERPRETACION

1. El desarrollo de bacilos, cocobacilos, cocos Gram negativos, cocos, diplococo gram positivos son sospechosos de causar la infección por lo que justifica su identificación.
2. El no desarrollo de gérmenes a 48 horas se reporta como CULTIVO NEGATIVO.

REFERENCIAS:

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnóstico microbiológico. 3a ed. Buenos Aires

REDACCION:

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SEMEN (ESPERMACULTIVO)		
POE N°: 08	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar el aislamiento de agentes, mediante el cultivo de muestras de semen de pacientes con sospecha de infección bacteriana.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Semen de pacientes con sospecha de infección bacteriana, en condiciones adecuadas para el cultivo.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Muestra de semen obtenida por masturbación.
- Mechero Bunsen
- Guantes de látex, mascarilla,
- Estufa de 35 – 37 °C
- Contenedor de material contaminado.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), Agar Chocolate, Agar Mc Conkey, Agar Manitol salado y otros medios que tenga disponible.

V. PROCEDIMIENTO

- Observar la muestra directa con solución salina estéril y buscar la presencia de células leucocitarias, hematíes, levaduras y otras estructuras.
- Realizar una coloración Gram y buscar la presencia de flora bacteriana.
- Colocar el inoculo en un extremo de la placa de agar sangre, agar chocolate, agar Mc Conkey y Agar Manitol salado, sembrar por agotamiento.
- Las placas de agar sangre y chocolate sembrarlas e incubarlas en microaerofilia a 37°C durante 18-24 horas. Las placas de Mac Conkey y Agar Manitol salado incubarlas a 37°C durante 18 – 24 horas.

VI. INTERPRETACION

- Si no hay crecimiento incubar 24 horas más.
- Si hay crecimiento de un solo tipo de colonia se procede a una identificación y sensibilidad.
- Si hay más de un tipo de colonia, proceder a examinarlas detenidamente en busca de colonias gris que pudieran ser *Neisseria sp.* o Pseudomonas sp. o colonias blancas sospechosas de levaduras.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: SIEMBRA PRIMARIA DE MUESTRA DE SEMEN (ESPERMACULTIVO)		
POE N°: 08	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

REFERENCIAS:

- Koneman E, Allen S, Dowell V, Sommers H. Diagnóstico microbiológico. 3a ed., Buenos Aires.
- Reisner B, Woods G, Thomson R, Danse L, García L, Shimizu R. Specimen processing. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999.

REDACCION:

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION:

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES:

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Staphylococcus		
POE N°: 09	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 6

I. OBJETIVO

Realizar identificación de cocos Gram positivos: Género Staphylococcus.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Staphylococcus.

IV.MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Estufa de 35 – 37 °C
- Mechero Bunsen o cabina de flujo laminar.
- Guantes de látex.
- Mascarilla.
- Contenedor de material contaminado.
- Cabina de Bioseguridad
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), Agar manitol salado, Medio Urea
- Reactivo Catalasa
- Caldo Voges Proskauer.
- Reactivo coagulasa
- Discos de sensibilidad Novobiocina y Polimixina B
- Kit de coloración Gram

V. PROCEDIMIENTO

1. Evaluar la morfología de las colonias desarrolladas en agar sangre o los agares selectivos.
2. Evaluar las zonas de hemolisis en agar sangre
3. Realizar un frotis y colorear con la coloración GRAM de las colonias sospechosas.
4. Si son cocos gram positivos realizar la prueba de la catalasa: Separar la Familia Micrococacceae (Genero Staphylococcus existen 3 especies de importancia clínica: *S. aureus, S. saprophyticus y S. epidermidis*) los cuales son catalasa +, de los Géneros Streptococcus y Enterococcus (catalasa -). Con controles positivos y negativos, evitar llevar algo de medio de agar sangre para evitar falsos positivos.
5. Evaluar el desarrollo de colonias en agar manitol salado.
6. Realizar el test de Bacitracina 0.04UI: Separar el *Streptococcus pyogenes* de los demás estreptococos beta hemolíticos.
   Procedimiento: Se realiza sembrando un gran inóculo, tomado con asa bacteriológica de un cultivo puro, que se estría sobre una placa de agar sangre en varias direcciones intentando obtener un cultivo confluente.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Staphylococcus		
POE N°: 09	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 6

Luego se coloca el disco de Bacitracina y se incuba 18- 24 horas a 37°C.

7. Realizar el Test de Furazolidona 100ug: Los Micrococos son resistentes a la furazolidona y por lo general crecen en el borde del disco de 6mm de furazolidona 100ug.
8. Realizar test de DNAasa: Permite diferenciar *S. aureus* que es la única especie dentro del Género Staphylococcus que posee DNAsa de las otras especies.

   Procedimiento: Se siembra una colonia de estafilococo en forma de moneda en una placa de medio sólido que contiene DNA y verde de metilo. Se incuba 18 horas a 35°. *Interpretación de resultados*: La formación de un halo transparente alrededor de la siembra indica presencia de DNAsa.

9. Realizar la prueba de coagulasa en tubo: Permite separar *S. aureus*, que posee coagulasa, de las otras especies de estafilococos que genéricamente se denominan coagulasa negativos.

   Procedimiento: Se emulsionan varias colonias en un tubo con 0,5ml de plasma citratado de conejo. Se incuba a 35° y se chequea la formación del coágulo a las 4 horas. Si es negativo se reincuba toda la noche y se procede a su lectura a las 18 horas. La lectura a las 4 horas, es fundamental porque en alguna oportunidad puede suceder que las fibrinolisinas de *S. aureus* lisen el coágulo luego de 18 horas de incubación y de esta manera se produzcan un test falso negativo.

   Interpretación de resultados: Se observa la formación de un coágulo total o parcial si el test es positivo.

10. Si son coagulasa positivo realizar la prueba de Voger Proskauer.

    Procedimiento: A 1 mL de cultivo añada 12 gotas (± 0,6 mL) de α- naftol al 5% en etanol y 4 gotas (± 0,2 mL) de KOH al 40%, agite y deje reposar por 5 a 10 minutos. *Interpretación*: La aparición de un color rosado constituye una reacción positiva indicadora de la presencia de acetoína, producto de la fermentación de la glucosa.

11. Si son coagulasa negativa realizar la prueba de resistencia a la Polimixina B y Novobiocina (5ug).

    SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA (5ug): Separar *S. saprophyticus* (resistente a la novobiocina) de los demás estafilococos coagulasa negativos.

    Procedimiento: Se siembra una placa de agar sangre con un hisopo embebido en una suspensión de la cepa a estudiar. Luego se aplica el disco de novobiocina y se incuba a 35° por 18 horas.

    Interpretación de resultados: Un halo de inhibición de crecimiento menor o igual a 16mm corresponde a *S. saprophyticus*.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Staphylococcus		
POE N°: 09	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 6

Un halo de inhibición mayor de 16mm corresponde a otros estafilococos coagulasa negativos.

12. Confirmar sub especie saprophyticus con el test de ureasa: El caldo de ureasa es un tipo de medio de cultivo que prueba la capacidad de la bacteria a producir una enzima, llamada ureasa, que se descompone en amonio y dióxido de carbono. El caldo contiene un tinte llamado "fenol rojo" que se hace rosa en presencia de amonio, indicando, así, una reacción positiva.

VI. INTERPRETACION

1. Las colonias de estafilococos son comúnmente grandes (2 – 3 mm a las 24 horas), convexas, lisas, enteras, opacas, y con frecuencia pigmentadas, a diferencia de las colonias de estreptococos y enterococos que son más pequeñas (menos de 2mm de diámetro), puntiformes, con aspecto translucido a semiopaco.
2. Los estafilococos pueden ser fuertemente β hemoliticos en agar sangre de carnero, pero las zonas de hemolisis son menores en relación al tamaño de las colonias que las generadas por los enterococos y estreptococos hemolíticos.
3. Los estafilococos se agrupan generalmente en racimos, a diferencia de los estreptococos y enterococos que se reúnen en pares o cadenas.
4. Las colonias de *Staphilococcus aureus* normalmente son grandes, estas siguen desarrollando si se deja e incuban por unos dias más. Son de borde entero, de superficie lisa, la mayoría de ellas presentan un pigmento que va desde el amarillo crema hasta el naranja
5. Las colonias de *Staphylococcus epidermidis* son algo pequeñas, de color blanquecino, dependiendo de las cepas, usualmente no se detecta pigmentos.
6. Las colonias de *Staphylococcus saprophyticus* son más grandes que *S. epidermidis*, son lustrosas y más convexas que otras colonias de estafilococos.
7. El género Staphylococcus y Micrococcus son catalasa positiva.
8. Manitol Salado: Las colonias que han acidificado el medio son presuntivas de *S. aureus* y *S saprophiticus*, mientras las colonias que desarrollan y no acidifican el medio es presuntivo de *S. epidermidis*.
9. Las bacterias que a la coloración GRAM son cocos gram positivos en racimos y catalasa positivos se deberán confirmar el género, se realiza con el test de bacitracina y Furazolidona que diferencia del género Micrococcus del Staphilococcus.
10. Test de Bacitracina: Si el halo de inhibición es ≥10mm será reportado como sensible y es característico para el género micrococcus, los staphilococcus son resistentes a bacitracina.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Staphylococcus		
POE N°: 09	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 4 de 6

11. Test de Furazolidona 100ug: Si el halo de inhibición es ≥15mm será reportado como sensible y es característico para el género Staphilococcus, los micrococcus son resistentes a furazolidona.
12. El *Staphylococcus aureus* en el 90% de los casos hidroliza el DNA asa, se sugiere confirmar con las siguientes pruebas descritas.
13. Si es del género Micrococcus no se reporta y el resultado se emite como CULTIVO NEGATIVO.
14. Si es del género Staphylococcus se siguen los siguientes test de identificación.
15. Prueba coagulasa - *Prueba en tubo:* La lectura realizarla a las 4 horas, Cualquier grado de coagulación es una prueba positiva. La mayoría de S. aureus formaran coagulo dentro de una hora. Si es negativa a las 4 horas seguir incubando hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Este es recomendado porque un pequeño número de cepas de S aureus pueden requerir más de 4 horas para la formación de coágulo. Considerar que S aureus produce fibrinolisina, lo cual puede lisar el coagulo.
16. Prueba de Voges Proskauer: Es útil en la confirmación y o diferenciación de *S. aureus* de *S. schleiferi* sub especie coagulans; al dar una reacción positiva es confirmatorio de *S. aureus* sub especie aureus.
17. Resistencia a la Novobiocina: Medir el halo de inhibición. Un halo ≤ 16 mm es resistente a la novobiciona, si es mayor entonces es sensible. La resistencia a novobiocina es intrínseca en *S. saprophyticus*
18. Ureasa: Esta prueba se realiza para confirmar la especie de *S. saprophiticus* sub especie saprophiticus, al tener una reacción positiva es confirmatorio y se realiza después del resultado de la prueba de novobiocina.
19. Resistencia a la Polimixina B: La resistencia a la polimixina B se define por una zona de inhibición menor de 20 mm. *S. aureus* y *S. epidermidis* son usualmente resistentes.
20. Prueba de la Ornitina Descarboxilasa o caldo descarboxilización de ornitina: Comparar los resultados con la tabla 3 que muestra las principales características de S. aureus y estafilococus coagulasa negativos comúnmente asociados con infecciones.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Staphylococcus		
POE N°: 09	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 5 de 6

Las identificaciones de los estafilococos coagulasa negativos son presuntivas y deben ser confirmadas en el Laboratorio Referencial.

	Pigmento de colonia	Hemolisina (*)	Estafilo coagulasa	Factor de aglutinación	Resistencia a novobiocina	Resistencia a polimixina B	Ornitina descarboxilasa	Acidez de manitol
S. aureus subespecie *aureus*	+	+	+	+	-	+	-	+
S. epidermidis	-	(d)	-	-	-	+	(d)	-
S. haemolyticus	d	(+)	-	-	-	-	-	d
S. lugdunensis	d	(+)	-	(+)	-	d	+	-
S. saprophyticus subespecie *saprophyticus*	d	-	-	-	+	-	-	d
S. schleiferi schleiferi	-	(+)	-	+	-	-	-	-
S. warneri	d	(d)	-	-	-	-	-	d

Diferencias entre: *S. aureus, S.saprophyticus y S.epidermidis*

CARACTERES	*S. aureus*	*S. saprophyticus*	*S. epidermidis*
COAGULASA	+	-	-
DNAsa	+	-	-
NUCLEASA TERMOESTABLE	+	-	-
PRESENCIA DE PROTEINA A	+	-	-
SUSCEPTIBILIDAD A LA NOVOBIOCINA	R	R	S

Diferencias entre el Género Staphylococcus y Género Micrococcus

CARACTERES	G. STAPHYLOCOCCUS	G. MICROCOCCUS
Bacitracina (disco 0.04 U)	positivo	negativo
Lisostafina	sensible	resistente
Utilización de glucosa anaerobia	positiva	negativa

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sistémica

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Staphylococcus		
POE N°: 09	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 6 de 6

REFERENCIAS

- Manual de Normas y procedimientos en microbiologia Hospital de Emergencias "José Casimiro Ulloa"
- Kloos W, Bannerman T. Staphylococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 264 – 282.
- Manual de procedimientos Bacteriologicos en infecciones intrahospitalarias, Serie de normas técnicas N° 28, 2005 Instituto Nacional de Salud – MINSA.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Enterococcus		
POE N°: 10	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Realizar identificación de cocos gram positivos: Género Enterococcus,

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Enterococcus.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Estufa de 35 – 37 °C
- Mechero Bunsen
- Guantes de látex, mascarilla.
- Contenedor de material contaminado.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), Agar ATS
- Reactivo Catalasa, Agar Bilis esculina, Tubos con caldo TSB con Cloruro de sodio 6.5%, Agar TSA con telurito de Potasio 0.04%, Caldo para descarboxilación de arginina, Kit de coloración Gram.

V. PROCEDIMIENTO

1. Evaluar la morfología de las colonias
2. Realizar la coloración GRAM a las colonias sospechosas.
3. Realizar la prueba de la catalasa
4. Realizar la prueba de esculina en medio con bilis.
5. Realizar la prueba de tolerancia a cloruro de sodio al 6.5%
6. Realizar la prueba de crecimiento en agar TSA con 0.04% telurito de potasio.
7. Realizar la prueba de asimilaron de carbohidratos.
8. Realizar la prueba de descarboxilación de arginina.

VI. INTERPRETACION

1. Usualmente son alfa hemolíticas o no hemolíticas en agar sangre de carnero 5% aunque también puede haber especies β hemolíticas como las cepas de *E. durans*.
2. Al realizar la coloración Gram, si se observan cocos Gram positivos y se presentan solos, en pares o en cadenas cortas, algunas veces cocobacilares.
3. Enterococcus es catalasa negativa, algunas veces se produce una seudocatalasa y se puede observar una débil efervescencia.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M. Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Enterococcus		
POE N°: 10	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

Esto ocurre cuanto *E. faecalis* se desarrolla en medios que contienen sangre, en este caso, subcultivar la colonia en estudio en TSA o agar Mueller Hinton y repetir la prueba.

4. Para determinar la facultad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa en presencia de bilis, el género Enterococcus spp evidencia una reacción positiva en tubo con ennegrecimiento difuso en el agar inclinado y en placa se observa un halo negro o marrón alrededor de las colonias. El 5% - 10% de Streptococcus del grupo viridans son bilis esculina positivos.
5. Reacción Tolerancia al cloruro de sodio 6.5%: Para determinar la facultad de un organismo de desarrollarse en presencia de una concentración de 6,5% de cloruro de sodio El género Enterococcus (95%) da reacción positiva dando reacción acida.
6. El desarrollo de colonias negras en agar TSA con 0.04% de telurito de potasio se identifica presuntivamente como *E. faecalis*.
7. En la prueba de asimilación de carbohidratos es positivo cuando existe viraje a un color amarillo en los diferentes carbohidratos sembrados por la producción de ácido.
8. En la prueba de descarboxilación de la arginina: es positivo cuando no hay viraje de color; es evidencia que la bacteria descarboxilo el aminoácido con productos alcalinos.

Diferencias en el Género Enterococcus.

	TELURITO	MANITOL	SORBOSA	ARGININA	ARABINOSA	RAFINOSA	SORBITOL
E. avium	–	+	+	–	+	–	+
E. raffinosus	–	+	+	–	+	+	+
E. saccharolyticus	–	+	+	–	–	+	+
E. faecalis	+	+*	–	+*	–	–	+
E. faecium	–	+*	–	+	+	v	v
E. durans	–	–	–	+	–	–	–
E. hirae	–	–	–	+	–	v	–
E. gallinarum	–	+*	–	+*	+	+	–
E. mundtii	–	+	–	+	+	+	v
Lactococcus	–	+	–	+	–	–	+

\+ ≥ 90% reacciones positivas.
– ≤ 10% reacciones positivas.
v reacciones variables.
* Excepciones ocasionales (<3% de cepas muestran reacciones aberrantes).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - REPUBLICA DEL PERU

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Enterococcus		
POE N°: 10	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS

- Manual de Normas y procedimientos en microbiología Hospital de Emergencias "José Casimiro Ulloa"
- Fuente: Facklam R, Sahm D, Martins L. Enterococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp. 297 – 305.
- Manual de procedimientos Bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias, Serie de normas técnicas N° 28, 2005 Instituto Nacional de Salud – MINSA

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Streptococcus		
POE N°: 11	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 4

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de cocos gram positivos: Género Streptococcus.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Streptococcus.

IV.MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Estufa de 35 - 37 °C
- Mechero Bunsen
- Guantes de látex, mascarillas.
- Contenedor de material contaminado.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero, Agar Chocolate, Desoxicolato de sodio al 2%, Desoxicolato de sodio al 10%,
- Reactivo Catalasa, Caldo tioglicolato.
- Disco de sensibilidad optoquina, bacitracina.
- Kit de coloración Gram.

V. PROCEDIMIENTO

1. Realizar la evaluación de las colonias.
2. Realizar la coloración Gram de las colonias sospechosas.
3. Realizar la prueba de catalasa.
4. Realizar la siembra de colonias con alfa hemolisis en caldo tioglicolato e incubar a 37°C
5. Inocular las colonias con alfa hemolisis en caldo inulina.
6. Realizar el test de sensibilidad a la Optoquina. Toda la colonia con alfa hemolisis será resuspendida para posteriormente ser sembrada por el método de teja en el agar TSA con sangre de carnero al 5%. Se colocará un disco de 6mm de diámetro con 5ug de optoquina e incubar de 35-37°C con 5% de CO2 durante 18 – 24 horas.
7. Realizar la prueba de desoxicolato de sodio al 10% en agar chocolate (método en placa) (1g de desoxicolato de sodio en 10mL de solución salina).
8. Realizar la confirmación del test de solubilidad a bilis (método tubo) (0.2g de desoxicolato de sodio en 10mL de solución salina)
9. Realizar el Test de solubilidad a bilis (método tubo): (0.2g de desoxicolato de sodio en 10mL de solución salina).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Streptococcus		
POE N°: 11	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 4

10. Realizar el test de CAMP, para las colonias beta hemolíticos: Realizar una estría de *Staphylococcus aureus*, y perpendicularmente a la estría se estrían las cepas de streptococus sospechosos de *S. agaliactae*, incubar a 35-37°C por 18-24 horas, no se recomienda la microerofilia por ser un efecto inhibitorio sobre el sinergismo.
11. Realizar el test de susceptibilidad a Bacitracina 0.04 UI.

VI. INTERPRETACION

1. Al realizar la evaluación de las colonias: Las colonias de la mayoría de los Streptococos son lisas, enteras, algo elevada. Miden aprox menos de 2mm de diámetro a las 24 horas. Si las placas se siguen incubando tres días a 34-37°C en microaerofilia las colonias aumentan en número, pero mantienen su tamaño.
2. Anotar el tipo de hemolisis desarrollado en el agar sangre, los *Streptococcus pyogenes* y *S. agaltiae* desarrollan beta hemolisis, *Streptococcus pneumonia*, *S. viridans* desarrollan alfa hemolisis, otros tipos de streptococcus no desarrollan hemolisis.
3. Al realizar la coloración Gram: Se observan cocos gram positivos en cadenas o diplococos lanceolados.
4. El género Estreptococcus es catalasa negativa.
5. La Inoculación en tubos con tioglicolato: Evidenciar el desarrollo de estreptococcus pneumoniae en tubos con tioglicolato, observar su desarrollo en microerofilia.
6. Metabolismo de inulina: Se inocula colonias de streptococcus sospechosos en caldo inulina, el único streptococo capaz de metabolizar inulina es el streotococcus pneumoniae.
7. Al realizar el Test de sensibilidad a la Optoquina: Sirve para diferenciar el *S. pneumoniae* de *viridans*; siendo el *S. pnuemonia* sensible a la optoquina, resultados: Si el halo de inhibición es ≥ 14mm es confirmatorio que es S. pneumoniae, si el halo de inhibición es de 9 – 13mm se deberá de realizar el test confirmatorio de solubilidad bilis, si el halo de inhibición es ≤ 8mm es indicativo que es presuntivo de *S. viridans*.
8. Una vez desarrollado colonias sospechosas en agar chocolate, agregar 1 gota de desoxicolato de sodio al 10%, las únicas colonias que desaparecen son las colonias presuntivas de *Streptococcus pneumoniae* desaparecen, es útil en la diferenciación de *Streptococcus pneumoniae* de *Streptococcus viridans*.
9. Realizar el procedimiento del test de solubilidad en tubo; si la cepa a estudiar es soluble se reporta como *Streptococcus pneumoniae*
10. Al realizar el Test CAMP: Al tener betahemolisis para la diferenciación de *S. pyogenes*.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Streptococcus		
POE N°: 11	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 4

En esta prueba se observa un efecto sinérgico que se produce al actuar el factor CAMP producido por cepas de *S. agalactiae* con la beta hemolisina del *Staphilococcus aureus* ambos productos se difunden por medio de cultivo para producir dicho efecto en forme de flecha cuando se utilizan agar sangre con hematíes ovinos o bovinos, *Streptococcus agalactiae* produce factor CAMP positivo, reportar la especie como *Streptococcus agalactiae*.

11. Al realizar el test de susceptibilidad a bacitracina: Cualquier tipo de halo de inhibición con un disco de bacitracina 0.04UI indica sensibilidad, los *S. pyogenes* son sensibles a bacitracina, mientras que los otros Estreptococos refieren resistencia a la bacitracina. Reportar como *Streptococcus pyogenes*.

Tabla de diferenciación de especies de Estreptococcus:

	Hemólisis	Bacitracina	SXT	CAMP	PYR	Bilis esculina	Caldo salado	Optoquina
Grupo A	β	S	R	-	+	-	-	R
Grupo B	β o γ	R	R	+	-	-	v	R
Grupos C, F y G	β	v	S	-	-	-	-	R
Enterococos	γ, β o α	R	R	-	+	+	+	R
Grupo D No enterococos	α o γ	R	S	-	-	+	-	R
Viridans	α o γ	v	S	-	-	v	-	R
Neumococo	α	v	S	-	-	-	-	S

Test de CAMP: Estreptococcus agalactiae:

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM POSITIVOS: Género Streptococcus		
POE N°: 11	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 4 de 4

REFERENCIAS

- Manual de Normas y procedimientos en microbiología Hospital de Emergencias "José Casimiro Ulloa"
- Fuente: Facklam R, Sahm D, Martins L. Enterococcus. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp. 297 – 305.
- Manual de procedimientos Bacteriologicos en infecciones intrahospitalarias, Serie de normas técnicas N° 28, 2005 Instituto Nacional de Salud – MINSA
- ROJAS, NORMA, MANUAL DE BACTERIOLOGIA 2006, FACULTAD DEMICROBIOLOGIA DE COSTA RICA, 2006

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM NEGATIVOS: Género Neisseria		
POE N°: 12	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de cocos gram negativos: Género Neisseria.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Neisseria.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Medio diferencial CTA - carbohidrato.
- Reactivo catalasa
- Estufa a 35-37°C
- Jarra de cierre hermético tipo GasPak System o jarra para anaerobiosis.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), Agar Chocolate, Agar Thayer Martin
- Reactivo oxidasa
- Disco de sensibilidad de Nitrocefin
- Kit de coloración Gram.

V. PROCEDIMIENTO

1. Realizar la evaluación de las colonias y realizar la coloración Gram.
2. Coloración Gram: Se observan diplococos gram negativo de forma arriñonada.
3. Prueba de la catalasa: Es catalasa positiva.
4. Prueba de oxidasa: Evidencia la presencia de la enzima citocromo oxidasa, es oxidasa positiva.

Observaciones: *De no contar con los reactivos y medios de cultivos para la confirmación de Neisseria gonorrhoeae, el aislamiento primario se enviará inmediatamente hacia el Instituto Nacional de Salud.*

Detección de cepas productoras de beta-lactamasas: Consiste en un disco de papel impregnado con cefalosporina (NITROCEFIN) que cambia de amarillo a rojo cuando el anillo beta-lactámicos es hidrolizado por la enzima beta-lactamasas. Esta prueba tiene un amplio espectro de susceptibilidad, es fácil de realizar y no requiere de mucho tiempo.

Procedimiento:

- Con la ayuda de una pinza estéril, coger un disco por prueba a realizar y colocarlo dentro de una placa Petri vacía.
- Humedecer el disco con 1 gota de agua destilada estéril.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM NEGATIVOS: Género Neisseria		
POE N°: 12	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

- impregnar varias colonias de *N. gonorrhoeae* en la superficie del disco humedecido con un asa estéril o un mondadientes.
- Observar la reacción durante 1 a 5 minutos.
- Si la cepa en estudio produce beta-lactamasa, el disco cambiara de a amarillo a rojo.
- Pro la seguridad que la prueba es satisfactoria, el laboratorio debe de contar con la cepa de referencia *N. gonorrhoeae* ATCC 31426, productora de beta-lactamasa. Si no se dispone de la mencionada cepa control, puede utilizarse *Escherichia coli* productora de beta-lactamasa.

VI. INTERPRETACION

- Evaluar la apariencia de las colonias; desarrollan en medio Thayer Martin y/o agar chocolate enriquecido, después de 18-24 horas de incubación. Las colonias de la mayoría del genero Neisseria son blanco grisáceas opacas y convexas en medio Thayer Martin, tienen un tamaño de 1-2 mm de diámetro, ligeramente levantadas, lobulares, translucidas y generalmente mucoides.

REFERENCIAS

- Manual de procedimiento para el diagnóstico bacteriológico de gonorrea – Serie de Normas Técnicas N ° 33- Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM NEGATIVOS: Género Moraxella		
POE N°: 13	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de cocos gram negativos: Genero Moraxella.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Moraxella.

IV.MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Reactivo de oxidasa y catalasa
b) Discos de antibiótico: Penicilina.
c) Kit de coloración Gram
d) Estufa a 35-37°C
e) Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), agar Mac Conkey, medio MIO, agar urea de Chiristensen, agar DNAasa, medio gelatina, medio OF glucosa.

V.PROCEDIMIENTO

1. **Apariencia de las colonias:** Todas las especies crecen en agar sangre, las colonias miden entre 0.3 – 2 mm de diámetro y no presentan pigmento. En el agar Mac Conkey no desarrollan o de lo contrario es muy pobre su desarrollo. En agar sangre y chocolate formando colonias redondas, opacas, convexas y de color gris, presentan el fenómeno de stick positivo.
2. **Coloración Gram:** Se observan diplococos, cocobacilos o diplobacilos gram negativos, algunas veces se puede observar encapsulados.
3. **Prueba de la catalasa:** Es catalasa positiva.
4. **Prueba de oxidasa**: Evidencia la presencia de la enzima citocromo oxidasa, es oxidasa positiva.
5. **Prueba de sensibilidad a Penicilina:** Las bacterias del genero Moraxella son sensibles al disco de penicilina de 10 unidades.
6. **Medio MIO (medio movilidad):** Todas las especies de Moraxella son inmoviles.
7. **Agar DNAasa**: Las especies de Moraxella no hidrolizan el DNA del agar DNAasa a excepcion del *M. canis*.
8. **Medio gelatina:** La unica especie que hidroliza gelatina es M. lacunata, las demas especies de Moraxella no hidrolisan la gelatina.
9. **Reduccion de Nitrato:** Todas las especies de Moraxella hidrolizan nitrato a nitrito, a excepción de *M. lincolnii y M. atlantae*

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoria y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOS GRAM NEGATIVOS: Género Moraxella		
POE N°: 13	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

10. **Medio OF glucosa:** *M. catarrhalis* Fermenta glucosa aerobiamente y no fermenta glucosa en anaerobiosis.
11. **Medio Urea**: Todas las especies de Moraxella son urea negativa a excepcion de *M. phenylpyruvica*.

Tabla de diferenciación de especies de Moraxella.

MORAXELLA	UREA	PAD	Hidrólisis de gelatina	Reduccion de nitrato	DNAasa	Penicilina	Morfologia
M. catarrhalis	-	-	-	+	-	s	c
M.lacunata	-	-	+	+	-	s	cb
M. monliquefaciens	-	-	-	+	-	s	cb
M.canis	-	-	-	+	+	s	c
M.phenylpyruvica	+	+	-	+	-	s	cb
M. atlantae M-3	-	-	-	-	-	s	cb

c: cocos s:sensible cb: cocobacilos

REFERENCIAS

- Diagnostico Microbiológico, Bailey & Scott, 12 ava edición, editorial panamericana. Koneman

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS: Genero Haemophilus		
POE N°: 14	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de cocobacilos gram negativos: Genero Haemophilus.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA:

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Genero Haemophilus.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agares seleccionados
- Medios selectivos.
- Reactivo de oxidasa.
- Reactivo catalasa
- Estufa a 35-37°C
- Kit de coloracion GRAM.
- Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), Agar chocolate suplementado, Agar Mac Conkey

V. PROCEDIMIENTO

1. **Apariencia de las colonias:** Las colonias generalmente son menores a 1um de ancho y de longitud variable, son inmoviles, no esporulados, aplastadas, entre incoloras y grises, opacas. El medio no presenta hemolisis ni decoloracion aparente, las cepas encapsuladas mas mucoides que las cepas que no presentan capsulas, las cuales apareces como colonias griceaseas compactas, son quimiorganotroficos para su desarrollo requieren de factor X y V, dichos factores que se encuentran en el agar chocolate y es γ hemolitico siendo sus colonias opacas y cremosas, desarrollan en agar sangre de conejo y/o caballo. La diferencia con H. haemolyticus es que esta especie genera β hemolisis en agar sangre con sangre de caballo y/o conejo, demuestran satelitismo al crecer alrededor del factor V producido por Staphilococcus aureus. La mayoría requieren del factor X (hemina) y/o del factorV (NAD). Requiere una atmosfera de 5-10% de CO2
2. **Coloración Gram:** aparecen como pequeños bacilos o cocobacilos gram negativos
3. **Prueba de la catalasa:** *H. influenzae* y *Haemophilus haemolyticus* es catalasa positvo, *H ducreyi* es catalasa negativa, *H parahemoliticus y parainlfuenzae* la reaccion es debil.
4. **Prueba de oxidasa**: *H. influenzae* es oxidasa negativa (95%), *H. haemoliticus*, *H. ducreyi*, *H. parahemoliticus* y parainfluenzae son oxidasa positiva.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD · REPUBLICA DEL PERU · Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria · DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD · DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE · Laboratorio de Salud Pública · V°B° · DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS: Genero Haemophilus		
POE N°: 14	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

5. **Crecimiento en agar chicoloate suplementado:** *H. influenzae* crece unicamente en agar chocolate suplementado el cual libera hemina y el suplemeneto nutritivo provee el factor (NAD), vitaminas, coenzimas, y aminoácidos necesarios.
6. **Crecimiento en agar chocolate con bacitracina 300ug/mL**: Este medio es utilizado para el aislamiento de *H. influenzae* a partir de muestras clínicas del tracto respiratorio alto.
7. **Hemolisis**: Esta prueba se realizar en agar sangre con sangre de conejo o caballo al 3% debido s que no liberan NADasa en el medio; Es importante para la diferenciación de *H. hemolyticus* y *H. parahemoliticus* (β hemolisis) de *H. influenzae* y *H. parainfluenzae* (γ hemolisis).
8. **Prueba de requerimiento de cofactores**: A partir de un aislamiento puro realice una siembra en una placa con agar tripticasa de soya, coloque los discos o tiras con factor X y V, sobre la superficie del agar a una distancia de 2cm entre ambos discos, incubar la placa a 37°C en 3-5% de CO2 durante 18-24 horas. Realizar las lecturas: Los aislamientos que dependen únicamente del factor X crecen alrededor del disco con factor X y los que dependen del factor V, crecerán alrededor del disco con factor V, los aislamientos que requieren de los dos factores crecerán en medio de ambos discos.
9. **Serotipificacion capsular**: Para realizar esta metodología, a cepa será enviada inmediatamente al INS.
10. **Diferenciación Bioquimica de especies de haemophilus**: Según cuadro adjunto:

	Especies de *Haemophilus*									
PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dependencia del factor V (NAD)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Porfirinas (factor X)	-	-	-	-	+	+	+	+	w	+
Indol	v	-	v	-	v	-	-	-	-	-
Urea	v	+	+	-	v	+	-	-	-	-
Ornitina	v	-	-	-	v	v	-	-	-	-
β hemólisis	-	-	+	(v)	-	+	-	-	-	-
Glucosa ácido	+	(+)	+	(v)	+	+	w	+	+	+
Glucosa, gas	-	-	v	-	(v)	(v)	-	+	+	v
Sacarosa	-	-	-	-	+	+	w	+	+	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Xilosa	+*	-	v	-	-	-	-	-	-	v
Ribosa	+	(+)	+	-	-	-	-	+	+	/
Manosa	-	-	-	-	+	-	-	+	+	/
ONPG	-	-	-	-	v	-*	v	+	+	
Oxidasa	-**	+	+	+	+	+	-	+	-	v
Catalasa	+	+	+	-	v	+*	v	-	-	+
H_2S	-**	-	+	-	+	+	-	+	-	+
Dependencia de CO_2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

1. *Haemophilus influenzae* (ver cuadro 2 biotipos)
2. *Haemophilus aegyptius*
3. *Haemophilus haemolyticus*
4. *Haemophilus ducreyi*
5. *Haemophilus parainfluenzae*
6. *Haemophilus parahaemolyticus*
7. *Haemophilus segnis*
8. *Haemophilus paraphrophilus*
9. *Haemophilus aphrophilus*
10. *Actinobacillus(Haemophilus) actynomycetemcomitans*

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS: Genero Haemophilus		
POE N°: 14	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS

- Diagnostico Microbiológico, Bailey & Scott, 12ava edición, editorial panamericana. Koneman
- Manual de Laboratorio para identificación y sensibilidad de Bacterias patógenas de importancia en Salud Pública en el mundo de desarrollo – OMS 2003
- Manual de procedimientos: Programa de vigilancia de los serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococs pneumoniae* y *Haemophilys influenzae*, Insituto Nacional de Colombia, Versión 4, 2004

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS O GRAM VARIABLES: GENERO GARDNERELLA		
POE N°: 15	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de cocobacilos gram negativos o gram variables: Género Gardnerella

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Gardnerella.

IV.MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Kit de coloración Gram
b) Cabina de bioseguridad.
c) Reactivo de oxidasa.
e) Reactivo catalasa
f) Estufa a 35-37°C
g) Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), agar chocolate suplementado.

VI. PROCEDIMIENTO

1. **Apariencia de las colonias:** bacilos cortos pleomórficos, no capsulados, no esporulados, sin fimbrias, sin flagelos, anaerobios facultativos, necesitan tensión reducida de CO2, colonias pequeñas, blancas grisáceas, rodeadas de beta hemolisis difusas.
2. **Coloración Gram:** Presencia de células clave o guía, cocobacilos gram positivos, Gram negativos o gram variables.
3. **Prueba de la catalasa:** Son catalasa negativa.
4. **Prueba de oxidasa**: Son oxidasa negativa.
5. **Aislamiento e identificación:** Requiere atmosfera de 5-7% de CO2
6. **Hidrólisis de hipurato:** la REaccion es positiva.
7. **Confirmación de *Gardnerella vaginalis***: Reacción de asimilación de carbohidratos: Glucosa, maltosa, sacarosa es positiva, manitol y almidón soluble es reacción negativa, LIA negativo, Ornitina negativo.
8. **Halo de inhibición**: sensible para discos de metronidazol (50ug), trimetropin.

REFERENCIA:

- Diagnostico Microbiológico, Bailey & Scott, 12 ava edicion, editorial panamericana. Koneman

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE COCOBACILOS GRAM NEGATIVOS O GRAM VARIABLES: GENERO GARDNERELLA		
POE N°: 15	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACIÓN

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO CAMPYLOBACTER		
POE N°: 16	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de cocobacilos gram negativos: Genero Campylobacter

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Genero Campylobacter

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Agares seleccionados
b) Cabina de bioseguridad
c) Kit de coloración Gram.
d) Reactivo de oxidasa.
e) Reactivo catalasa
f) Estufa a 35-37°C
g) Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), agar Campylobacter

V. PROCEDIMIENTOS

1. **Apariencia de las colonias**: Colonias planas, no hemolíticas de aspecto acuoso, grisáceas, con bordes irregulares, y con tendencia a diseminarse. Muchas veces se pueden ver incoloras.
2. **Coloración Gram**: Debido a que el microorganismo no se tiñe bien con safranina, se recomienda el uso de carbolfuscina al 0.8% como oloracion de contraste
3. **Prueba de la catalasa**: Son catalasa positiva.
4. **Prueba de oxidasa**: Son oxidasa positiva.
5. **Aislamiento e identificación**: Requiere atmosfera de 5-10% oxigeno y 3-10%CO2
6. **Motilidad**: Se realiza por microscopia optica, de contraste de fase o campo oscuro, donde se observa espiralados o con forma de S con movimientos en espiral o tirabuzon.
7. **Generador es de abiente microaerofilo**: Jarra con vela: La combustión de la vela aporta una atmosera aproximada de 17-19% de oxigeno y de 2-4% de CO2, mejora el aislamiento del microrganismo si se incluye al medio de cultivo el suplemento FBP que aumenta alrededor de 10 veces la aerotolerancia del mismo. Se postila que el rendimiento del metodo es mayor a 42°C que ha 37°C
   Generador casero: Reduce la atmosfera de oxigeno por consumo en reacción quimica y aumenta la de CO2 por medio de disolución de bicarbonato en agua: Una pastilla de boranato de sodio (0.8 g para una jarra de 3 litros), Una pastilla de Alka Seltzer y 10mL de agua destilada.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - REPUBLICA DEL PERU

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO CAMPYLOBACTER		
POE N°: 16	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

8. **Temperatura de incubacion**: Las especies termofilas de incubación crecen mejor a 42°C que ha 37°C.
9. **Sensibilidad al acido nalidixico y cefalotina**: Se siembra en una concentración similar al 1 Mac Farland, sobre la superficie de agar Mueller Hinton y/o agar Campy, colocar un disco de ácido nalidixico de 30ug y un disco de cefalotina de 30ug e incubar durante 48horas.
10. **Producción de ácido sulfihidrico**: Se determina depositando una ansada en el centro de la columna del tubo del medio de Lior. Los tubos se mantienen por 4 horas a temperatura ambiente. La aparición de una coloración negra alrededor del inóculo indica una reacción positiva. En caso de dudas, la incubación puede prolongarse a temperatura ambiente o a 37°C. Una alternativa consiste en usar medio de cultivo TSI o Kligler incubando en microaerofilia
11. **Crecimiento en ClNa al 3,5%:** Sembrar una asada de una cepa en un tubo con caldo nutritivo con 3,5% de cloruro de sodio. Incubar 3-5 días a 37°C en microaerofilia. Observar si hay desarrollo (turbidez).
12. **Distribución de pruebas de identificación de Campylobacter**:

	C. jejuni		*C. coli*	*C. lari*	*C. upsaliensis*
	jejuni	doyle			
Hidrólisis del hipurato	+	+	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+
Producción de catalasa	+	+	+	+	-/d
Crec. Caldo Cl Na 3,5%	-	-	-	-	-
Producción de SH_2	-	-	-	+	-
R. Ac. Nalidíxico	V	V	S	R	S
R. cefalotina	R	V	R	R	S
Indoxil acetato	+	+	+	-	+
TTC	S/d		S	S	
Glycina 1%	+	+	+	+	V

S: sensible R: resistente d: débil V: variable TTC: cloruro trifenil tretazolium

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - REPÚBLICA DEL PERU

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO CAMPYLOBACTER		
POE N°: 16	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

Temperatura de crecimiento del Genero Campylobacter

	25°C	37°C	42°C
C. jejuni subsp. Jejuni	-	+	+
C. jejuni subsp. Doylei	-	+	-
C. coli	-	+	+
C. fetus subsp. Fetus	+	+	D
C. fetus subsp. Veneralis	+	+	-
C. lari	-	+	+
C. upsaliensis	-	+	+
C. hyointestinalis	d	+	D
C. sputorum subsp. sputorum	-	+	+
C. sputorum subsp. bubulus	d	+	-
C. curvus	-	+	+
C. rectus	-	+	D
C. showae	-	-	+

REFERENCIAS

- Diagnostico MIcrobiologico, Bailey & Scott, 12 ava edicion, editorial panamericana. Koneman

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO AEROMONAS		
POE N°: 17	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de cocobacilos gram negativos: Género Aeromonas

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Aeromonas

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Agares seleccionados
b) Cabina de bioseguridad
c) Kit de coloración Gram.
d) Reactivo de oxidasa.
e) Reactivo catalasa
f) Estufa a 35-37°C
g) Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), agar Mac conkey, agua peptonada alcalina, agar XLD,

V.PROCEDIMIENTO

1. Apariencia de las colonias:
2. Coloración Gram: Bacilos Gram negativos
3. Prueba de oxidasa: Son oxidasa positiva.
4. Movilidad: Son móviles
5. Fermentación de glucosa: Fermentan glucosa
6. Reacción de indol: Positiva
7. Fenómeno Suicida: Se colocan cepas desconocidas en medio de caldo que contienen glucosa 0.5%, *Aeromona hidrophila* es no suicida, *Aeromona sobria* es suicida variable, *Aeromona caviae* es suicida.
8. Reacción de esculina: *A. hydrophila* es esculina positiva, *A. sobria* es esculina negativa, *A. caviae* es esculina positiva.
9. Cuadro de distribución de reacciones para la diferenciación bioquímica:

						descarboxilasa			Fermentacion		
Microroganismo	hemolisis	DNAasa	Indol	RM	VP	Lisina	Ornitina	Esculina	Sacarosa	manitol	gas de glucosa
Aeromona hidrophila	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Aeromona caviae	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
Aeromona sobria	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO AEROMONAS		
POE N°: 17	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

REFERENCIAS

- Diagnostico Microbiológico, Bailey & Scott, 12 ava edicion, editorial panamericana. Koneman

REDACCION

Lic.. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO PLESIOMONAS		
POE N°: 18	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar la identificación cocobacilos gram negativos: Genero Plesiomonas

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Genero Plesiomonas

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad
b) Kit de coloración Gram.
d) Reactivo de oxidasa.
e) Reactivo catalasa
f) Estufa a 35-37°C
g) Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), agar Mac conkey, agua peptonada alcalina, agar XLD

V.PROCEDIMIENTO

1. **Apariencia de las colonias:** Las colonias miden en promedio 1.5 mm de diametro y son grises, brillantes, lisas, opacas y pueden estar ligeramente elevadas en el centro.
2. **Coloración Gram:** Bacilo gram negativo Movil, recto, redondeado y corto, con flagelos polares.
3. **Prueba de oxidasa**: Son oxidasa positiva.
4. **Movilidad**: Son moviles
5. **Fermentacion de glucosa**: Fermentan glucosa
6. **Reaccion de indol**: Positiva
7. Reaccion de esculina: *P. shigeloides* es esculina negativa

					descarboxilasa			Fermentacion		
Microroganismo	hemolisis	DNAasa	Indol	VP	Lisina	Ornitina	Esculina	Sacarosa	manitol	gas de glucosa
Plesiomona shigeloides	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-

REFERENCIAS:

- Diagnostico MIcrobiologico, Bailey & Scott, 12 ava edicion, editorial panamericana. Koneman

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO PLESIOMONAS		
POE N°: 18	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERÚ - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO PSEUDOMONA		
POE N°: 19	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de bacilos gram negativos: Género Pseudomona

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Pseudomona

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad
b) Kit de coloración Gram.
c) Reactivo de oxidasa.
d) Reactivo catalasa
e) Estufa a 3b-37°C
f) Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), agar Mac conkey, agar TSA o Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

1. **Apariencia de las colonias**: Las colonias generalmente son planas, algo extendidas, bordes aserrados y tienen un brillo metálico, Algunas cepas de *P. aeruginosa* pueden no producir pigmentos, frecuentemente estas cepas son bastante mucoides y se aíslan a partir de muestras de secreciones respiratorias de pacientes con fibrosis quística.
2. **Coloración Gram**: Bacilo gram negativo.
3. **Agar TSI**: *P. aureginosa* da una reaccion K/K o N/N y no hay produccion de sulfuro de hidrogeno.
4. **Prueba de utilización de citrato**: 95% de cepas de *P. aeruginosa* son positivas.
5. **Prueba de hidrólisis de gelatina**: Todas las cepas de *Pseudomona fluorecens* hidrolisan gelatina.
6. **Prueba de oxidasa**: El 99% de cepas de *Pseudomona aeruginosa* son oxidasa positvo.
7. **Prueba de reducción de Nitrato a Nitrito**: El 98% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* reducen nitrato.
8. **Crecimiento a 42°C**: Todas las cepas de *P. aeruginosa* crecen a 42°C
9. **Producción de pigmentos**: Verificar producción de pigmentos en agar Mueller Hinton o Agar tripticasa de soya; *P. aeruginosa* produce pigmento verdoso, azul verdoso brillante, rojo o marron

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD V°B° DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO PSEUDOMONA		
POE N°: 19	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

Prueba	*P. aeruginosa*	*P. fluorescens*	*P. putida*
Oxidasa	99	97	100
Crecimiento en:			
Agar Mc Conkey	100	100	100
42° C	100	0	0
Reducción de nitrato	98	19	0
Pioverdina	65	96	93
Indol	0	0	0
Hidrólisis de la Gelatina	82	100	0
Citrato de Simmons	95	93	94(6)

REFERENCIAS

- Kiska D, Gilligan P. Pseudomonas. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed.Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 517 – 25.
- Manual de procedimientos Bacteriologicos en infecciones Intrahopitalarias – Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 20	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 6

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de bacilos gram negativos: Género Enterobacteriaceae.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Género Enterobacteriaceae.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad
b) Kit de coloración Gram.
c) Reactivo de oxidasa.
d) Reactivo catalasa
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), agar Mac conkey, medios diferenciales bioquimicos.

V.PROCEDIMIENTO

1. **Apariencia de las colonias:** En agar Mac Conkey, *Escherichia coli* es lactosa positiva forma colonias de borde entero de color fuscia, opacas de 2-3 mm de diámetro usualmente rodeado de una zona opaca alrededor de la colonia (bilis preciptado), hay cepas de E. coli que son lactosa negativa que dan colonias incoloras de 3-4mm de diametro. *Klebsiella pneumoniae* forma colonias de borde entero, de color rosado a rosado oscuro de 3-4mm de diámetro y aspecto mucoide. Enterobacter forma colonias de borde entero de color rosado de 2-4mm de diametro, no tan mucoides como la Klebsiella. La gran mayoria de cepas de Proteus generan fenomeno swarming.
2. **Coloración Gram:** Son gram negativos, algunas cepas presentan capsulas.
3. **Test oxidasa:** Todas las enterobacterias son oxidasa negativas
4. **Agar TSI:** Determina la capacidad de la bacteria de utilizar glucosa, lactosa y sacarosa con producción o no de hidrogeno sulfurado y de gas.
5. **Agar LIA:** Se determina simultáneamente la producción de lisina descarboxilasa y la formación de ácido sulfhídrico, generalmente las cepas del grupo Proteus y Providencia desaminan la lisina a ácido α cetocarbonico formando compuestos pardos rojizos en la región superficial del medio con la sal de hierro y bajo la influencia de oxígeno.
6. **Utilizacion de Citrato:** Es utili para detrminar si un microroganismo es capaz de utilizar el citrato como unica fuente de carbono para su metabolismo.
7. **Hidrólisis de Urea**: Es util para determinar si un organismo es capaz de degradar urea, formando dos moleculas de amoniaco por acción de la enzima ureasa.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERÚ - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 20	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 6

8. **Rojo de Metilo:** Permite comprobar la capaciad de un organismo para producir y mantener estables los productos terminales acidos de la fermentación de la glucosa determinando cualitativamente el pH del medio.
9. **Voges Proskauer:** Es util para determinar la capacidad de algunos microorganismos de degradar la glucosa hasta acetilmetilcarbinol (acetoina) a traves de un proceso de fermentación.
10. **Motilidad (Medio SIM o MIO):** Para determinar si un organismo es movil o inmóvil, a su vez el medio SIM permite visualizar si el organismo produce hidrogeno sulfurado y el medio MIO permite visualizar si el organismo descarboxila Ornitina.
11. **Prueba de Indol:** Es util para dceterminar la capacidad de un microorganismo de producir indol a partir de aminoacido triptófano.
12. **Produccion de descarboxilasa:** La pruebas dedescarboxilacion se realizan para medir la capacidad enzimatica de un microorganismo para descaboxilarun aminoacido, el que da a lugar a una amina, produciendo la alcalizacion del medio.

Apariencia de las colonias según Agar Mac Conkey:

Utilizan lactosa	Enterobacterias	Caracteristicas de la colonia
Rapidamente positivas	Escherichia coli	Medianas, planas y rojas o rosadas
	Klebsiella spp	Medianas o grandes, mucosas y rosadas
	Enterobacter spp	Medianas o grandes y rojas o rasadas.
Lentas y positivas	Citrobacter	Medianas e incoloras a 24 horas y ligeramente rosadas a las 48 horas
	Serratia spp	
	Providencia spp	
Negativas	Salmonella spp	De tamaño pequeñas o medianas incoloras o transparantes
	Shigella spp	
	Proteus spp	
	Edwarsiella spp	
	Yersinia spp	

Apariencia de las colonias en Agar SS:

Utilizan lactosa	Enterobacteria	Caracteristica de las colonias
Negativo(Colonias transparentes o translucidas	Shigella spp	Pequeña, plana y transparente
	Salmonella spp	Mediana, transparente con centro negro totalmente
	Proteus spp	Mediana, negra y de borde irregular
	Yersinia spp	Pequeñas y transparentes
Positivo(Colonias rosadas o rojas)	La mayoria de las enterobacterias	Medianas, irregulares y grandes Rosadas o rojas

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 20	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 6

Identificación presuntiva de Escherichia coli productora de toxina shiga O157:

Prueba/medio	Caracteristicas	Resultado
Agar Mac conkey Sorbitol	Fermentacion de Sorbitol	-
Agar Mac conkey	Fermentacion de Lactosa	+
Utilizacion de Citrato	Desarrollo	-
H2S	Produccion	-

Posteriormente una vez repicado la cepa en un agar no selectivo se procede a enfrentar la cepa al anticuerpo Policlonal O157, al dar una reaccion de aglutinación positiva, se enfrentará contra el anticuerpo monoclonal O157:H7.

Diferenciacion Bioquimica de las enterobacterias mas frecuentes en aislamientos de muestras clinicas

Enterobacteria	CITRATO	TSI	LIA	UREA	INDOL	RM	VP	MOV	ORNIT	MANITOL	R. NITRATO	DNAasa(25°C)
Escherichia coli	-	A/A , gas(+), H2S(-)	V	-	+	+	-	+	V	+	+	-
Escherichia coli inactiva	-	K/A, gas(-), H2S(-)	V	-	V	+	-	-	-	+	+	-
Escherichia fergusonii	-	K/A, gas(+), H2S(-)	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Escherichia hermanii	-	V/A, gas(+), H2S(-)	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
Salmonella spp	v	K/A, gas(-), H2S(V)	+	-	-	+	-	v	+	+	+	-
Salmonella paratyphi A	-	K/A, gas(+), H2S(V)	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Salmonella typhi	-	K/A, gas(-), H2S(+)	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
Salmonella enterica sub especie enterica	+	K/A, gas(+), H2S(+)	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
Klebsiella pneumoniae sub especie pneumoniae	+	A/A, gas(+), H2S(-)	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Klebsiella oxytoca	+	A/A, gas(+), H2S(-)	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
Klebsiella rhinoscleromatics	-	K/A,gas(-), H2S (-)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
Enterobacter aerogenes	+	A/A,gas(+),H2S(-)	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Enterobacter agglomerans	v	V/A,gas(+), H2S(-)	-	-	-	V	V	V	-	+	+	-
Enterobacter cloacae	+	A/A,gas(+), H2S(-)	+	V	-	-	+	+	+	+	+	-
Citrobacter freundii	+	V/A,gas(+), H2S(V)	-	v	V	+	-	+	-	+	+	-
Citrobacter koseri(diversus)	+	V/A,gas(+), H2S(-)	-	v	+	+	-	-	+	+	+	-
Proteus vulgaris	V	K/A,gas(+),H2S(+), desaminacion	-	+	+	+	-	+	-	-	+	v
Proteus mirabilis	V	K/A,gas(+),H2S(+), desaminacion	-	+	-	+	V	+	+	-	+	v
Proteus hauseri	-	K/A,gas(-),H2S(V), desaminacion	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
Providencia rettgeri	+	K/A,gas(-),H2S(-); desaminacion	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-
providencia stuartii	+	K/A,gas(-),H2S(-); desaminacion	-	-	+	+	-	V	-	-	+	-
Morganella morganii sub especie morganii	-	K/A,gas(+), H2S(-)	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Yersinia enterocolitica	-	K/A,gas(-),H2S(-),	-	v	v	+	-	-	+	+	+	-

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 20	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 4 de 6

Identificacion de Salmonella:
Las colonias sospechosas de Salmonella se visualizan en el agar Mac conkey como Colonias incoloras, en el agar SS Incoloras con centro negro, en el agar XLD Rojas con centro negro.

P. bioquimicas	S. typhi	S. Paratyphi	Salmonella spp
S2H	trazas	-	+
Lisina descarboxilasa	+	-	+
Ornitina descarboxilasa	-	+	+
Arginina dehidrolasa	-	-	+
Glucosa(gas)	-	+	+
Citrato	-	-	+
Urea	-	-	-
Indol	-	-	-
Motilidad	+	+	+

Identificacion de Yersinia:
Cocobacilo gram negativo, con coloracion giemsa se observa la bipolaridad caracteristica; en los cultivos de 72 horas de yersinia pestis tiene forma de huevo estrellado, los cultivos de 48 horas muestran forma de cobre amartillado, Catalasa positivo, desarrolla mejor a 28°C.

Identificacion de especies de Shigella:

1. Reacciones Bioquímicas de *Shigella* spp.

Especie	D-Manitol	ONPG	Ornitina decarboxilasa
Sh. dysenteriae	-	-	-
Sh. flexneri	+	-	-
Sh. sonnei	+	+	+
Sh. boydii	+	-	-

Identificacion de Vibrio:

Prueba de la cuerda: Es util para excluir las especies que no son vibrio particularmente de las aeromonas, se emulsiona una porcion de la colonia sospechosa con una gota de solucion acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5%, una reaccion positiva se evidencia al formase una cuerda mucoide.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 20	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 5 de 6

Identificación bioquímica de Vibrio.

Prueba	V. cholerae	V. parahemolyticus	V. alginolyticus
Oxidasa	+	+	+
Gas glucosa	-	-	-
Sacarosa	+	-	-
Lactosa	-	-	-
Citrato	d	+	+
LIA	+	+	+
VP(24h)	d	-	+
NaCl 0%	+	-	-
NaCl 3%	+	+	+
NaCl 6%	-	+	+
NaCl 8%	-	+	+
NaCl 10%	-	-	+
TCBS	Amarillo	Verde	Amarillo
Inh O/129 fosfato 10ug	S	R	R
Inh O/129 fosfato 150ug	S	S	S

Conformacion de V cholerae con antisuero O1 monoclonal Inaba y Ogawa:
Una reaccion positiva por cualquiera de los antisueros Inaba o Ogawa es sufieciente para confirmar la identificación de un aislamiento de V cholerae O1, solo se deberan usar los antisueros monoclonales cuando reaccione positivamente con el antisuero polivalente O1. Debera de remitirse la cepa hacia el Instituto Nacional de Salud.
Confirmacion de V cholerae O139: La confirmación de V cholerae O139 incluye las pruebas para la producción de enterotoxina colerica y la verificación del antigeno O139. (Enviar cepa hacia el INS).

REFERENCIAS

- Kiska D, Gilligan P. Pseudomonas. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed.Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 517 – 25.
- Manual de procedimientos Bacteriologicos en infecciones Intrahopitalarias – Instituto Nacional de Salud.
- Diagnostico MIcrobiologico, Bailey & Scott, 12 ava edicion, editorial panamericana. Koneman

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 20	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 6 de 6

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO BRUCELLA		
POE N°: 21	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Realizar la identificación de cocobacilos gram negativos: Genero Brucella

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Colonias bacterianas sospechosas de pertenecer al Genero Brucella

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Agares seleccionados
b) Cabina de bioseguridad
c) Kit de coloración Gram.
d) Reactivo de oxidasa.
e) Reactivo catalasa
f) Estufa a 35-37°C
g) Medios de cultivo: Agar sangre de carnero (AS), agar Mac conkey, medio bifasico Ruiz castañeda, medios diferenciales bioquímicos.

V. PROCEDIMIENTO

1. **Apariencia de las colonias:** Crecen lentamente en agar sangre y chocolate
2. **Coloración Gram:** Son cocobacilos gram negativo diminuto
3. **Test oxidasa:** Todas las enterobacterias son oxidasa positivo
4. **Test de Catalasa:** Son catalasa positiva.
5. **Reducciond e Nitrato:** Reducen nitrato a nitrito.
6. **Indol:** Son indol negativas.
7. **Voges proskauer:** Son Negativos
8. **Produccion de ureasa:** *Brucela melitensis, B. abortus* producen débilmente ureasa y *Brucella suis* produce fuertemente ureasa.
9. **Sensibilidad a Fucsina 1:25 000:** Desarrollan *Brucella abortus* y *B. melitensis*, mas es inhibida en su desarrollo *Brucella suis*.
10. **Sensibilidad a Thionina 1:50 000:** Desarrollan *Brucella melitensis* y suis, es inhibida *Brucella abortus*.
11. **Requerimiento de CO2:** *Brucella abortus* requiere necesariamente de CO2
12. **Produccion de H2S:** *Brucella Suis* produce en mayor cantidad H2S y quien no produce es *Brucella melitensis*.

Confirmación de especie: Se debe de enviar la cepa aislada hacia el INS lo mas pronto posible

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE BACILOS GRAM NEGATIVOS: GENERO BRUCELLA		
POE N°: 21	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

.REFERENCIA

- Diagnostico MIcrobiologico, Bailey & Scott, 12 ava edicion, editorial panamericana. Koneman

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Laboratorio de Referencia Nacional - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PREPARACION DEL AGAR MUELLER HINTON PARA PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER		
POE N°: 22	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la preparación agar Mueller Hinton para prueba de sensibilidad metodo Kirby Bauer

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Medio de cultivo.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Agares Mueller Hinton
b) Cabina de bioseguridad.
c) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
d) Autoclave
e) Placas
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V. PROCEDIMIENTO

1. Preparar el medio a partir del agar base deshidratado de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
2. Autoclavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50°C
3. Una vez esterilizado y solidificado medir el pH del agar, el valor del mismo debe de encontrarse entre 7.2 – 7.4 a temperatura ambiente.
4. Repartir el medio en placas Petri 60 – 70mL para placas de diámetro interno de 150 mm; o repartir 25-30mL para placas de 100mm de diámetro., de tal manera que el grosor del agar en la placa sea de 4mm.
5. Realizar las pruebas de esterilidad para cada lote de Mueller Hinton, incubando dos placas de cada lote durante 24 horas a mas, las placas una vez utilizadas deben de ser descartadas.

REFERENCIA

- Diagnostico MIcrobiologico, Bailey & Scott, 12 ava edicion, editorial panamericana. Koneman.
- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método De disco difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PREPARACION DEL AGAR MUELLER HINTON PARA PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER		
POE N°: 22	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - REPUBLICA DEL PERU

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION)		
POE N°: 23	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 4

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad metodo Kirby Bauer.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepas bacterianas

Comprende la determinación de la susceptibilidad antibiótica mediante el método de disco difusión (Kirby – Bauer) e interpretación de los resultados, de las bacterias que a continuación se señalan:

- *Staphylococcus spp*
- *Staphylococcus aerus*
- *Enterococcus spp*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter spp*
- *Enterobacterias*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus spp*
- *Haemophilus spp*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Agar Mueller Hinton
- Agar Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero
- Discos de sensibilidad antibiótica
- Tubo ajustado a la escala 0.5 Mac Farland

V. PROCEDIMIENTO

Los antibióticos han sido distribuidos para este efecto en dos grupos:

Grupo 1: En este grupo se encuentran los antibióticos de base indispensables para orientar el tratamiento de las diferentes infecciones, cuya inclusión en el antibiograma y reporte de los mismos es de carácter OBLIGATORIO (Ver POE para cada microorganismo).

Grupo 2: Este grupo reúne antibióticos complementarios cuya inclusión en el antibiograma y reporte es de carácter OPCIONAL, depende de los esquemas de antibioterapia vigentes y de la epidemiología local de la resistencia bacteriana (Ver POE para cada microorganismo).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION)		
POE N°: 23	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 4

Inoculación de las Placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Inocular la superficie seca de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo (Figura 1). Antes de colocar los discos dejar secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido

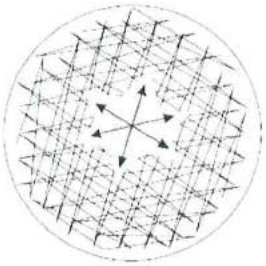


Figura 1. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar

APLICACIÓN DE LOS DISCOS

Colocar los discos individuales o multidiscos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril o la punta de una aguja presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.

Distribuir los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. No colocar más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

INCUBACIÓN

Incubar lar placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.

Las placas de *Haemophilus spp* y *Streptococcus spp*, deben ser incubadas en atmósfera del 5% de CO2.

Después del tiempo recomendado de incubación examinar cada placa y medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco. En los casos de *Staphylococcus spp* y Enterococcus spp el tiempo de incubación debe prolongarse por 24 horas para una mejor detección de la resistencia a Oxacilina y Vancomicina, respectivamente.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERÚ - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION)		
POE N°: 23	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 4

LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador. Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo. En los medios suplementados con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa. Tener cuidado de no medir la zona de hemólisis sino la de inhibición del crecimiento.

Para *Staphylococcus spp* o *Enterococcus spp*, usar luz transmitida, manteniendo la placa arriba de la luz para examinar un posible ligero crecimiento de cepas resistentes a Oxacilina/Meticilina o Vancomicina dentro de los halos aparentes de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de resistencia a Meticilina (Oxacilina) o Vancomicina.

El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Sin embargo, las colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, re identificadas y reensayadas. Algunos *Proteus spp*, debido a su gran movilidad, pueden presentar un velo de invasión o "swarming" dentro de las zonas de inhibición de algunos antibióticos. En estos casos el velo del swarming debe ser ignorado al momento de medir los halos de inhibición.

Cuando se prueban discos de Cotrimoxazol puede arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición, en estos casos no considerar en la lectura un crecimiento del 20% o menos del desarrollo total.

REFERENCIA

- Diagnostico MIcrobiologico, Bailey & Scott, 12 ava edicion, editorial panamericana. Koneman.
- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de Normas Técnicas N° 30.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION)		
POE N°: 23	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 4 de 4

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Staphylococcus spp.*		
POE N°: 24	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método disco difusión, Serie de normas técnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - REPUBLICA DEL PERU

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección de Redes Integradas de Salud Pública - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Staphylococcus spp.*		
POE N°: 24	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad método Kirby Bauer para *Staphylococcus spp*

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa de *Staphylococcus spp.*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balón, etc.
c) Autoclave
d) Placas con agar Mueller Hinton 150 – 100mm
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

Inoculo:

Realizar una suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton, solución salina al 0.9 % o Caldo BHI a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18 – 24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo I:

Oxacilina
Penicilina
Eritromicina
Clindamicina
Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)
Vancomicina
Gentamicina
Ciprofloxacina

Grupo II:

Cloramfenicol.
Rifampicina.
Tetraciclina.
Teicoplanina
Nitrofurantoína (1)
Norfloxacina (1)

(1) Disco utilizado exclusivamente en cepas provenientes de infecciones de las vías urinarias.

Resistencias Naturales

Los estafilococos son resistentes a Ácido Nalidixico, Ácido Pipemídico y Aztreonam
Staphylococcus saprophyticus es resistente a Fosfomicina y Novobiocina
Staphylococcus cohnii y *Staphylococcus xylosus* son resistentes a Novobiocina y a Lincomicina.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Enterococcus spp.*		
POE N°: 25	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad metodo Kirby Bauer para *Enterococcus spp*

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa de *Enterococcus spp*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton 150 – 100mm
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

INÓCULO

Método del crecimiento o suspensión directa de la colonia equivalente al patron de tubidez 0,.5 Mac Farland.

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo II:

Teicoplanina
Rifampicina
Cloramfenicol
Tetraciclina
Eritromicina
Nitrofurantoína (1)
Norfloxacina (1)
Ciprofloxacina (1)
Levofloxacina (1)

Grupo I:

Ampicilina
Gentamicina (disco con contenido de 120 mg)
Estreptomicina (disco con contenido de 300 mg)
Vancomicina

(1) Disco utilizado exclusivamente en cepas provenientes de infecciones de las vias urinarias.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Staphylococcus spp.*		
POE N°: 24	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

VI. LECTURA

A las 16 – 18 h. A las 24 h para el disco de Oxacilina

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

- Disco de Penicilina: El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Penicilina es válido también para Ampicilina y Amoxicilina.
- Disco de Oxacilina: El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Oxacilina es válido también para Dicloxacilina y Cloxacilina.
- La resistencia a Oxacilina señala una resistencia cruzada a todas las penicilinas (asociadas o no a inhibidores de betalactamasas), cefalosporinas de todas las generaciones y carbapenems, sin excepción.
- Las cepas resistentes a Penicilina y sensibles a Oxacilina son sensibles a las penicilinas asociadas a los inhibidores de betalactamasas, a las cefalosporinas y a los carbapenems.
- El disco de Oxacilina no debe incluirse en el antibiograma de *Staphylococcus saprophyticus* pues con
- frecuencia al utilizar los diámetros críticos válidos para los otros estafilococos coagulasa negativos, se le clasifica incorrectamente como resistente a este antibiótico.
- Disco de Tetraciclina: El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Tetraciclina es válido también para Doxiciclina y Minociclina.
- Disco de Eritromicina: El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Eritromicina es válido también para la Azitromicina, Claritromicina y Roxitromicina.
- Disco de Ciprofloxacina: El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Ciprofloxacina es válido también para la Ofloxacina y Levofloxacina.
- Disco de Vancomicina: Si se tiene una zona de inhibición de 14 mm o menos, se recomienda la medición de la CIM de este antibiótico para descartar una posible "sensibilidad disminuida".

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos para *Staphylococcus spp.* (Ver Anexo N° 01).

CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO
Staphylococcus aureus ATCC 25923

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M. Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Enterococcus spp.*		
POE N°: 25	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

Resistencias Naturales

Los enterococos son resistentes a oxacilina, cefalosporinas, Clindamicina, y Cotrimoxazol.

Los enterococos presentan una resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos, lo cual no suprime la sinergia con los betalactámicos, por tanto, deben utilizarse discos con mayores concentraciones de antibiótico que las habituales buscando detectar una resistencia de alto nivel que si elimina el efecto sinérgico.

Enterococcus gallinarum y *Enterococcus casseliflavus* son resistentes a los glicopéptidos.

VI. LECTURA

A las 16 – 18 h. A las 24 h para el disco de Vancomicina.

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

Disco de Ampicilina: Si la cepa es sensible a Ampicilina lo es también a Penicilina, la Amoxicilina, asociaciones de penicilinas e inhibidores de betalactamasas, e Imipenem.

En caso de resistencia a Ampicilina, se recomienda la realización del test de la nitrocefina para la detección de una penicilinasa. Esta resistencia enzimática a Ampicilina (test de la nitrocefina positivo) es cruzada con Penicilina y Amoxicilina.

Discos de Vancomicina y Teicoplanina: Si la cepa es intermedia a Vancomicina y/o Teicoplanina, se recomienda la medición de la CIM de estos antibióticos para descartar una posible resistencia.

Discos de Gentamicina y Estreptomicina: Si la cepa es intermedia a Gentamicina y/o Estreptomicina, se recomienda la medición de la CIM de estos antibióticos para descartar una posible resistencia de alto nivel.

Disco de Tetraciclina: El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Tetraciclina es válido también para Doxiciclina y Minociclina.

Disco de Eritromicina: El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Eritromicina es válido también para Azitromicina, Claritromicina y Roxitromicina.

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos para *Staphylococcus spp.* (Ver Anexo N° 01).

CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Enterococcus spp.*		
POE N°: 25	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el metodo disco difusión, Serie de normas técnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Pseudomonas aeruginosa*		
POE N°: 26	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad método Kirby Bauer para *Pseudomonas aeruginosa*

II.ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton 150 – 100mm
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V. PROCEDIMIENTO

INÓCULO

Método del crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo I:
Ceftazidima
Imipenem y/o Meropenem
Gentamicina
Amikacina
Ciprofloxacina

Grupo II:
Aztreonam
Cefoperazona/sulbactam
Cefepime
Norfloxacina (1)
Ofloxacina (1)

(1) Disco utilizado exclusivamente para infecciones de las vías urinarias

Resistencias Naturales

Pseudomonas aeruginosa es resistente a Penicilina, Ampicilina, Amoxicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación, Cefotaxima, Ceftriaxona, Kanamicina, Tetraciclina, Cloramfenicol, Ácido Nalidíxico y Ácido Pipemídico.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Pseudomonas aeruginosa*		
POE N°: 26	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

LECTURA

A las 16 – 18 h.

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma.

- **Disco de Ceftazidima:** Si la cepa tiene susceptibilidad intermedia (I) o resistente (R) a Ceftazidima debe informarse también como intermedia (I) o resistente (R) al Aztreonam aun cuando el resultado del disco indique sensibilidad (resistencia cruzada).

- **Disco de Aztreonam**: Una resistencia aislada del Aztreonam en relación con una sensibilidad conservada para los otros betalactámicos (cefalosporinas y carbapenems) es posible y debe informarse como tal.

- **Discos de carbapenems**: Si una resistencia disociada entre Meropenem e Imipenem (sensible a uno y resistente al otro) es detectada deberá verificarse la técnica y repetirse la prueba. Si la resistencia disociada se confirma, la cepa deberá ser enviada al INS.
- Una resistencia aislada a Imipenem y/o Meropenem en relación con una sensibilidad conservada para otros betalactámicos (cefalosporinas, monobactams y combinaciones cefalosporina / inhibidor de betalactamasas) es posible y debe informarse como tal.

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos para Staphylococcus spp. (Ver Anexo N° 01).

CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método disco difusión, Serie de normas técnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Pseudomonas aeruginosa*		
POE N°: 26	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 27	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad método Kirby Bauer para Enterobacterias

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiologia clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa que pertenecen al Género Enterobacteriaceae

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton 150 – 100mm
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

INÓCULO

Método de crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo I:
Ampicilina
Cefalotina
Ampicilina / Sulbactam o Amoxicilina / Ácido Clavulánico.
Cefuroxima
Cefotaxima o Ceftriaxona
Gentamicina
Amikacina
Ácido Nalidíxico (1)
Norfloxacina (1)
Ciprofloxacina
Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)
Nitrofurantoina (1)

Grupo II:
Cefoxitina
Aztreonam
Ceftazidima
Cefixima
Cefoperazona/Sulbactam
Cefepime o Cefpirome
Imipenem o Meropenem
Cloramfenicol
Ofloxacina (1)

(1) Disco utilizado exclusivamente para infecciones de las vías urinarias.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 27	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

Resistencias Naturales

- Las enterobacterias son resistentes a Penicilina, Oxacilina, Macrólidos, Clindamicina y Glicopéptidos.
- *Klebsiella spp* es resistente a las Aminopenicilinas.
- Citrobacter freundii, Enterobacter cloacae y Enterobacter aerogenes son resistentes a las aminopenicilinas, aminopenicilinas/Inhibidores de betalactamasas, cefalosporinas de primera generación y Cefuroxima.
- *Serratia marcescens* es resistente a las Aminopenicilinas, Aminopenicilinas/Inhibidores de betalactamasas, Cefalosporinas de primera generación y Cefoxitina.
- Proteus mirabilis es resistente a Nitrofurantoína, Proteus vulgaris es resistente a las Aminopenicilinas, Cefalosporinas de primera generación, Cefuroxima y Nitrofurantoína.
- Morganella morganii es resistente a las Aminopenicilinas, Aminopenicilinas/Inhibidores de betalactamasas, Cefalosporinas de primera generación, Cefuroxima y Nitrofurantoína.
- *Providentia stuartii* es resistente a las Aminopenicilinas, Aminopenicilinas/Inhibidores de
- betalactamasas, Cefalosporinas de primera generación, Gentamicina (bajo nivel) y Nitrofurantoína.

LECTURA

A las 15 – 18 h.

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

- **Disco de Ampicilina:** El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Ampicilina es también válido para Amoxicilina. Tomar en cuenta las resistencias naturales de las enterobacterias para el reporte.
- **Disco de Ampicilina/Sulbactam y Amoxicilina/Ácido Clavulánico:** En enterobacterias no existe una disociación de resultados para estos discos por lo que debe utilizarse uno solo de ellos en el antibiograma.
- Tomar en cuenta las resistencias naturales de las enterobacterias para el reporte.
- **Disco de Cefalotina:** El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Cefalotina es generalmente válido para la Cefazolina. También es válido para Cefadroxilo, Cefradina, Cefalexina, Cefaclor y Loracarbef pero únicamente de las cepas aisladas de infecciones urinarias.
- **Disco de Tetraciclina:** El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Tetraciclina es válido también para la Doxiciclina y Minociclina.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERÚ - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA GENERO ENTEROBACTERIACEAE		
POE N°: 27	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

- **Discos de Cefalosporinas de tercera generación y Aztreonam:** Para *Enterobacter spp., Serratia marcescens, Citrobacter freundii, Proteus vulgaris, Haemophilus haemolyticus* y Providentia stuartii un resultado intermedio o resistente a Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima o Aztreonam obliga a reportar como intermedio o resistente a todo este grupo de antibióticos.
  El disco de Cefixima no debe utilizarse en el antibiograma de *Morganella morganii.*
  Algunas cepas de enterobacterias, principalmente de *Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae*, son clínicamente resistentes a las Cefalosporinas de tercera generación y al Aztreonam debido a la producción de "betalactamasas de espectro extendido". Este tipo de resistencia puede ser difícil de detectar en el antibiograma estándar.

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos para Staphylococcus spp. (Ver Anexo N° 01).

Cepa de Referencia para el control de calidad interno
Escherichia coli ATCC 25922.
Escherichia coli ATCC 35218 (para combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas).

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método disco difusión, Serie de normas técnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERÚ - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*		
POE N°: 28	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad metodo Kirby Bauer para *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa que pertenece a *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton 150 – 100mm
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

INÓCULO

Método de crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Ampicilina
Cloramfenicol
Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)
Ciprofloxacina
Cefotaxima

VI. INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS

Antibióticos y Diámetros Críticos para SALMONELLA - SHIGELA:

El criterio de interpretación de los halos de sensibilidad de los discos son los mismos que para enterobacterias.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*		
POE N°: 28	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

Disco de Cefalotina:

En el caso de *Salmonella spp* y *Shigella spp* las Cefalosporinas de primera y segunda generación no son eficaces clínicamente por lo que deben ser reportadas como resistentes a estos antibióticos aún cuando se observe actividad in vitro.

Discos de Aminoglucósidos:

En el caso de *Salmonella spp.* y *Shigella spp* los Aminoglucósidos no son eficaces clínicamente por lo que deben ser reportadas como resistentes a estos antibióticos aún cuando se observe actividad in vitro.

REFERENCIA

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método disco difusión, Serie de normas técnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA GENERO VIBRIO		
POE N°: 29	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad método Kirby Bauer para Vibrio.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa que pertenece al Género Vibrio

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton 150 – 100mm
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

INÓCULO

Método de crecimiento o suspensión directa de la colonia. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.

DISCOS DE SENSIBILIDAD A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo I:

Ampicilina
Cloramfenicol
Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)
Tetraciclina

Además, pueden incluirse otros antibióticos ausentes en la lista según necesidades de la vigilancia de resitencia antimicrobiana.

Resistencias Naturales:

Son resistentes a Penicilina, Oxacilina, Macrólidos, Clindamicina y Glicopéptidos.

LECTURA

16 – 18 h

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA GENERO VIBRIO		
POE N°: 29	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos para *Staphylococcus spp.* (Ver Anexo N° 01).

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

Disco de Ampicilina:

Es la clase representativa de la Ampicilina y Amoxicilina.

Disco de Tetraciclina:

Los resultados con discos de Tetraciclina pueden ser usados para predecir la sensibilidad a la Doxiciclina.

Cepas de Referencia para el control de calidad interno:

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35218 (para combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas).

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método disco difusión, Serie de normas tecnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantia de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Streptococcus pneumoniae* (NEUMOCOCO)		
POE N°: 30	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad metodo Kirby Bauer para Streptococcus pneumoniae

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa de *Streptococcus pneumoniae*.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas con agar Mueller Hinton
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V. PROCEDIMIENTO

INOCULO

Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton o solución salina al 0.9% a partir de una placa de agar sangre de carnero de crecimiento, incubada 16 –18 horas. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.
Agar Mueller Hinton con un suplemento de 5% sangre de carnero
No aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm, ni más de 5 en las placas de 100 mm.

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo I:
Oxacilina
Eritromicina
Cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol)
Cloramfenicol
Vancomicina
Tetraciclina

Grupo II:
Rifampicina
Teicoplanina
Levofloxacina o Esparfloxacina o Moxifloxacina

Resistencias Naturales:
El Neumococo es resistente a Aztreonam y Pefloxacina.
El Neumococo presenta una resistencia de bajo nivel a los aminoglucósidos.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Streptococcus pneumoniae* (NEUMOCOCO)		
POE N°: 30	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

INCUBACIÓN: 35°C en atmósfera de 5% de CO2.

LECTURA: 20 – 24 horas

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

Disco de Oxacilina:
Cuando el halo de inhibición del disco de Oxacilina es igual o superior a 20 mm, la cepa de Neumococo es sensible a Penicilina y a los siguientes antibióticos: Ampicilina, Amoxicilina, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina/Sulbactam, Cefaclor, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Cefixima, Cefepime, Loracarbef, Imipenem y Meropenem.
Cuando el halo de inhibición del disco de Oxacilina es igual o inferior a 19 mm puede tratarse de una cepa de Neumococo sensible, de bajo nivel de resistencia o de alto nivel de resistencia a Penicilina.

Tampoco es posible determinar el grado de resistencia a los otros betalactámicos basado únicamente en los resultados del disco de Oxacilina, por lo que se recomienda determinar la CIM de ciertos antibióticos que pueden ser eficaces en el tratamiento de infecciones debidas a Neumococo resistente Penicilina (Amoxicilina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Imipenem y Meropenem).
En infecciones severas debidas a Neumococo (meningitis, bacteriemia) se recomienda determinar la CIM de la cepa para Penicilina, Cefotaxima (o Ceftriaxona) y Meropenem. La Vancomicina debe también estudiarse en estos casos, sea incluyendo el disco de este antibiótico en el antibiograma o por determinación de la CIM.

Disco de Eritromicina:
El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Eritromicina es también válido para Azitromicina, Roxitromicina y Claritromicina.

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos. (Ver Anexo N° 01)

CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO:
Streptococcus pneumoniae ATCC 49619.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Streptococcus pneumoniae* (NEUMOCOCO)		
POE N°: 30	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el metodo disco difusión, Serie de normas tecnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Streptococcus spp. (EXCEPTO PNEUMOCOCO)		
POE N°: 31	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad metodo Kirby Bauer para *Streptococcus spp.*(Excepto Pneumococo)

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa de *Streptococcus spp.* (Excepto Pneumococo)

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton 150 – 100mm
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V. PROCEDIMIENTO

INOCULO

Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton o solución salina al 0.9% a partir de una placa de agar sangre de carnero de crecimiento, incubada 16 –18 horas. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.
Agar Mueller Hinton con un suplemento de 5% sangre de carnero.

NOTA: No aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm, ni más de 5 en las placas de 100 mm.

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo I:
Ampicilina o Penicilina G (solo para Estreptococos betahemolíticos)
Eritromicina
Clindamicina
Cefotaxima o Ceftriaxona
Cloramfenicol

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Streptococcus spp. (EXCEPTO PNEUMOCOCO)		
POE N°: 31	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

Grupo II:
Levofloxacina (solo para estreptococos betahemolíticos)
Ofloxacina (solo para estreptococos betahemolíticos)
Cefepime
Vancomicina
Teicoplanina

Resistencias Naturales:
Los Estreptococos son resistentes a Aztreonam y Pefloxacina.
Los Estreptococos presentan una resistencia de bajo nivel a los Aminoglucósidos.

INCUBACIÓN
35°C en atmósfera de 5% de CO_2.

LECTURA: 20 – 24 h

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma
Discos de Penicilina - Ampicilina:
La interpretación del resultado de estos discos es solo válida para los Streptococcus beta - hemolíticos.
Para el estudio de la sensibilidad a Penicilina del *Streptococcus viridans* aislado de líquidos normalmente estériles debe determinarse la CIM.
Las cepas sensibles a Penicilina deben ser consideradas sensibles igualmente a: Amoxicilina, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Ampicilina/Sulbactam, Cefalotina, Cefaclor, Cefazolina, Cefradina, Cefuroxima, Cefotaxima, Ceftriaxona, Loracarbef, Cefepime, Imipenem y Meropenem.
Disco de Eritromicina:
El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Eritromicina es también válido para Azitromicina, Roxitromicina y Claritromicina.
Discos de Ofloxacina y Levofloxacina:
La interpretación del resultado de estos discos es solo válida para los Streptococcus beta - hemolíticos.

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos. (Ver Anexo N° 01).

CEPA DE REFERENCIA PARA EL CONTROL DE CALIDAD INTERNO:
Streptococcus pneumoniae ATCC 49619

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Streptococcus spp. (EXCEPTO PNEUMOCOCO)		
POE N°: 31	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el metodo disco difusión, Serie de normas tecnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Haemophylus spp.*		
POE N°: 32	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad metodo Kirby Bauer para *Haemophylus spp.*

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa de *Haemophylus spp*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton 150 – 100mm
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

INOCULO

Se realizara el test de sensibilidad e medio Haemophilus Test medium (HTM).
NOTA: No aplicar más de 9 discos en las placas de 150 mm, y ni más de 5 en las placas de 100 mm.
Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton o solución salina al 0,9 % a partir de un cultivo en agar chocolate de 20 – 24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland.
NOTA: No preparar inóculos densos superiores a 0,5 de la escala de Mc.Farland,

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo I:
Ampicilina
Ampicilina/Sulbactam o Amoxicilina/Ácido Clavulánico
Cefaclor
Cefuroxima
Ceftriaxona o Cefotaxima
Cotrimoxazol (Trimetoprim/Sulfametoxazol)
Cloramfenicol

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Haemophylus spp.*		
POE N°: 32	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

Grupo II:
Cefixima.
Cefepime
Aztreonam
Azitromicina o Claritromicina
Levofloxacina o Ciprofloxacina o Moxifloxacina u Ofloxacina
Rifampicina
Tetraciclina
Meropenem

INCUBACIÓN
35°C en atmósfera de 5% de CO_2

Resistencias Naturales:
Los Haemophilus son resistentes a Clindamicina y Lincomicina.

LECTURA
16 – 18 h
Al realizar la medición del halo de inhibición no considerar la zona de desarrollo débil o de pequeñas colonias que pueden encontrarse cercanas al borde neto del halo.

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos. (Ver Anexo N° 01).

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

Disco de Ampicilina:
El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Ampicilina es también válido para Amoxicilina.
Para detectar una posible resistencia a Ampicilina y Amoxicilina por producción de una betalactamasa recomendamos la realización del test de la nitrocefina.
Una resistencia a Ampicilina con un test de nitrocefina negativo obliga a informar la cepa como resistente A Amoxicilina, Ampicilina/Sulbactam, Amoxicilina/Ácido Clavulánico, Cefaclor y Cefuroxima, a pesar de una aparente actividad in vitro.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Haemophylus spp.*		
POE N°: 32	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

Cepas de referencia para el control de calidad interno

Haemophilus influenzae ATCC 49247

Haemophilus influenzae ATCC 49766

E. coli ATCC 35218 (para combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas)

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el metodo disco difusión, Serie de normas tecnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoría y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA *Acinetobacter spp.*		
POE N°: 33	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para la prueba de sensibilidad metodo Kirby Bauer para *Acinetobacter spp.*

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa de *Acinetobacter spp.*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V. PROCEDIMIENTO

INOCULO

Metodo del crecimiento o suspension directa de la colonia. Ajustar la turbidez equivalente al estandar 0.5 de la escala de Mc Farland.

DISCOS DE SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA A INCLUIR EN EL ANTIBIOGRAMA

Grupo I:
Ceftazidima
Imipenem o meropenem
Gentamicina
Amikacina
Ciprofloxacino

(1)Discos utilizados en infecciones urinarias.

Grupo II:
Ampicilina/sulbactam
Aztreonam
Cefotaxima o Ceftriaxona
Cefepime
Norfloxacino (1)
Ofloxacino (1)
Tetraciclina (1)
Trimetropim /sulfametoxazol (1)
Cloranfenicol

Resistencias Naturales:

Acinetobacter baumannii y *Acinetobacter calcoaceticus* son resistentes Penicilina, Ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación y a furanos.
Acinetobacter haemolyticus es resistente a Gentamicina y Amikacina.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - REPUBLICA DEL PERU

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Acinetobacter spp.		
POE N°: 33	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

INCUBACIÓN
35°C
LECTURA
16 – 18 h

Reglas para la lectura e interpretación del antibiograma

Disco de Tetraciclina:
El resultado del estudio de sensibilidad con el disco de Tetraciclina no es necesariamente válido para Doxiciclina y Minociclina.
Actividad del Sulbactam:
El Sulbactam, un inhibidor de betalactamasas, posee una actividad intrínseca sobre el *Acinetobacter spp.*
La reciente aparición en EE.UU. de diámetros críticos para medir la actividad de Ampicilina/Sulbactam sobre *Acinetobacter spp.* permite incluir esta asociación entre los antibióticos para el antibiograma de esta especie.
Actividad de la Rifampicina:
La Rifampicina es utilizada en algunos países para el tratamiento en asociación de infecciones ocasionadas por *Acinetobacter spp.* multirresistente.
Sin embargo, debido a la inexistencia de diámetros críticos en el sistema norteamericano (CLSI) para medir la actividad de Rifampicina sobre *Acinetobacter spp.* no hemos incluido este antibiótico en ninguno de los dos grupos de antibióticos para esta especie.

INTERPRETACIÓN DE LOS DIÁMETROS CRÍTICOS: Antibióticos y Diámetros Críticos. (Ver Anexo N° 01).

Cepas de referencia para el control de calidad interno

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 35218 (para combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas).

REFERENCIAS

- Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el metodo disco difusión, Serie de normas tecnicas N° 30 Lima, 2002, Instituto Nacional de Salud.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA Acinetobacter spp.		
POE N°: 33	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE BETA LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).		
POE N°: 34	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 4

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la deteccion de BLEE en cepas bacterianas.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepa de Klebsiella penumoniae, Escherichia coli, Klebsiella oxytoca y Proteus mirabilis.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

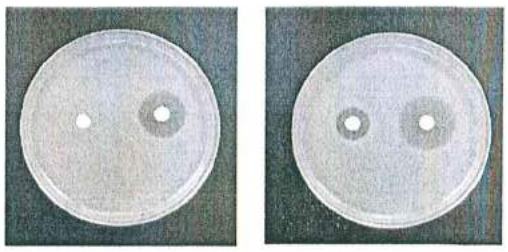
V. PROCEDIMIENTO

Algunas cepas productoras de estas enzimas pueden presentar halos de inhibición lo suficientemente grandes como para ser clasificadas erróneamente como sensibles a las Cefalosporinas de tercera generación y a Aztreonam. Con el objeto de superar esta dificultad, el cuadro señala los diámetros para Ceftazidima, Cefotaxima, Ceftriaxona y Aztreonam que serán utilizados como test de tamizaje y que permiten sospechar la presencia de estas enzimas: Si la cepa estudiada presenta halos de inhibición, para al menos uno de estos antibióticos, iguales o inferiores a los diámetros referidos en El cuadro deberá realizarse un test confirmatorio de la presencia de "betalactamasas de espectro extendido".

Test confirmatorio de la presencia de "betalactamasas de espectro extendido" (según el CLSI - USA):

Este test requiere el uso de discos habituales de Ceftazidima (30 mg), Cefotaxima (30 mg), así como de Ceftazidima/Acido Clavulánico (30/10 mg) y Cefotaxima/Acido Clavulánico (30/10 mg), con los que se realiza un test de disco difusión sin ninguna variante.

Si los discos de Ceftazidima/Acido Clavulánico y Cefotaxima/Acido Clavulánico presentan zonas de inhibición superiores 5 mm a aquellos producidos por los discos de Ceftazidima y Cefotaxima, respectivamente, se considera el test como positivo



Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE BETA LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).		
POE N°: 34	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 4

La deteccion de BLEE esta recomendado en ***Klebsiella pnuemoniae, Escherichi coli, Klebsiella oxytoca*** y ***Proteus mirabilis.***

Test	Criterios para realizar test confirmatorio BLEE	Test confirmatorio BLEE
Metodo	Disco difusión	Disco difusión
Medio	Müller Hinton Agar	Müller Hinton Agar
Concentración antimicrobiana	Para *K. pneumoniae, K. oxytoca y E. coli*: Cefpodoxime 10 ug ó Ceftazidime 30 ug ó Aztreonam 30 ug ó Cefotaxime 30 ug ó Ceftriaxone 30 ug Para *P. mirabilis*: Cefpodoxime 10 ug ó Ceftazidime 30 ug ó Cefotaxime 30 ug (Usando mas de un agente antimicrobiano incrementa la posibilidad para detectar BLEE)	Ceftazidime 30 ug Ceftazidime-clavulanico 30/10 ug y Cefotaxime 30 ug Cefotaxime-clavulanico 30/10 ug
Inóculo	Procedimiento estandar para disco difusión	Procedimiento estandar para disco difusión
Incubación	35°C +/- 2°C	35°C +/- 2°C
Periodo de incubación	16 - 18 horas	16 - 18 horas
Resultados	Para *K. pneumoniae, K. oxytoca y E. coli*: Cefpodoxime halo ≤ 17 mm Ceftazidime halo ≤ 22 mm Aztreonam halo ≤ 27 mm Cefotaxime halo ≤ 27 mm Ceftriaxone halo ≤ 25 mm Para *P. mirabilis*: Cefpodoxime halo ≤ 22 mm Ceftazidime halo ≤ 22 mm Cefotaxime halo ≤ 27 mm Los halos anteriores pueden indicar producción de BLEE	Un incremento de ≥ 5 mm en el diámetro del halo para cualquier agente antimicrobiano probado en combinación con clavulanato vs el diámetro del halo del agente cuando se prueba solo = BLEE (ejm: ceftazidime = 16 mm; ceftazidime-clavulanico = 21 mm).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE BETA LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).		
POE N°: 34	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 4

Control de calidad interno (según el CLSI – 2018)

Test	Criterios para realizar test	Test confirmatorio BLEE
Metodo	Disco difusión	Disco difusión
Recomendaciones para Control de Calidad	Control de calidad para rutina (diario o semanalmente) usar: K. pneumoniae ATCC® 700603 ó E. coli ATCC® 25922 (Ver tabla 4A-1) K. pneumoniae ATCC® 70060: Cefpodoxime halo 9–16 mm Ceftazidime halo 10–18 mm Aztreonam halo 9–17 mm Cefotaxime halo 17–25 mm Ceftriaxone halo 16–24 mm	Control de calidad para rutina (diario o semanalmente) usar: K. pneumoniae ATCC® 700603 ó E. coli ATCC® 25922 (Ver tabla 4A-1) QC aceptable: E. coli ATCC® 25922 ≤ 2 mm incrementa en el diametro del halo para los antibioticos + clavulanico vs el diametro del halo cuando se prueba solo. K. pneumoniae ATCC® 700603: ≥ 5 mm incrementa el diametro del halo de ceftazidime-clavulanico vs ceftazidime. ≥ 3 mm incrementa en la zona del halo de cefotaxime-clavulanico vs cefotaxime.

Test confirmatorio de la presencia de "betalactamasas de espectro extendido" (según el Comité de Antibiograma de la Sociedad Francesa de Microbiología):

Este test requiere el uso de discos habituales de Amoxicilina/Acido Clavulánico (20/10 mg), Ceftazidima (30 mg) y/o Cefotaxima (30 mg) y/o Aztreonam (30 mg) y/o Ceftriaxona, con los que se realiza un test de disco difusión sin ninguna variante.

Los discos de Ceftazidima, Aztreonam, Cefotaxima y Ceftriaxona se disponen a 30 mm del disco de moxicilina/Ácido Clavulánico (distancia de centro a centro de los discos). Si una imagen de sinergia aparece entre el disco Amoxicilina/Ácido Clavulánico y los discos de Ceftazidima y/o Aztreonam y/o Cefotaxima y/o Ceftriaxona, se considera el test como positivo.

Reporte de antibiograma de las enterobacterias productoras de "betalactamasas de espectro extendido":

Una vez detectadas las cepas productoras de estas "betalactamasas de espectro extendido" deben ser reportadas como resistentes a todas las penicilinas, las cefalosporinas de todas las generaciones (icluyendo los de cuarta generación) y al Aztreonam, cualquiera que sea el diámetro de los discos de estos antibióticos.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

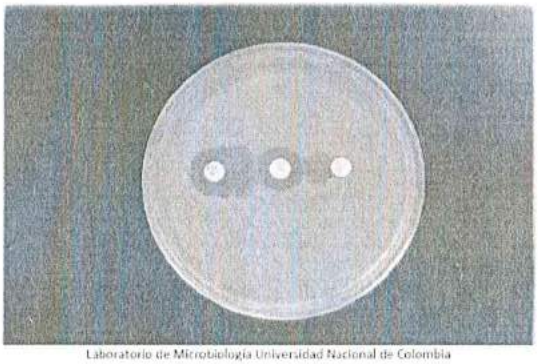
MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE BETA LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE).		
POE N°: 34	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 4 de 4

Prueba alternativa Doble disco para la detección de BLEE: Este método de doble disco fue descrito por Jarlier en 1988 y consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido calvulánico (20/10 µg) en el centro de una placa a una distancia de 20 mm se coloca un disco de ceftazima (30 µg) y al otro lado un disco de cefotaxima (30 µg). La ampliación de alguno de los halos de inhibición manifiesta la producción de la BLEE.

Figura No. 2 Prueba doble disco para detección BLEE



Laboratorio de Microbiología Universidad Nacional de Colombia

REFERENCIAS:

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.

REDACCION:

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pùblica DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE AMP C MEDIADA POR PLASMIDO		
POE N°: 35	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la deteccion de AMP C mediada por plasmido.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepas de *K pneumoniae, Salmonella spp* y *Proetus mirabilis*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balon, etc.
c) Autoclave
d) Placas com agar Mueller Hinton
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton.

V. PROCEDIMIENTO

Prueba de Disco para AmpC

Esta prueba esta basada en el uso de un disco que contiene Tris-EDTA para permeabilizar la célula de la bacteria y permitir la liberación de la β lactamasa al ambiente externo.

Siguiendo las recomendaciones de CLSI para el método de difusión en disco se extiende sobre una placa de Mueller Hinton una cepa sensible a cefoxitin que es *E. coli* ATCC 25922, se coloca sobre la superficie del agar un disco de cefoxitin de 30µg y junto al este se coloca el disco de Tris EDTA sobre el cual se colocan varias colonias del microorganismo a probar. Se incuba en aerobiosis a 35ºC con la placa invertida.

Resultado positivo: Se observa un aplastamiento o hendidura en la zona de inhibición cerca al disco de cefoxitin, indicando inactivación de la enzima.

Esta prueba proporciona una detección confiable de AmpC mediada por plásmido en organismos gram negativos como son *K. pneumoniae, Salmonella spp y P mirabilis*. Esta prueba no es muy confiable para aislamientos de E. coli debido a que este microorganismo puede tener AmpC mediada por plásmidos y por cromosoma.

REFERENCIAS:

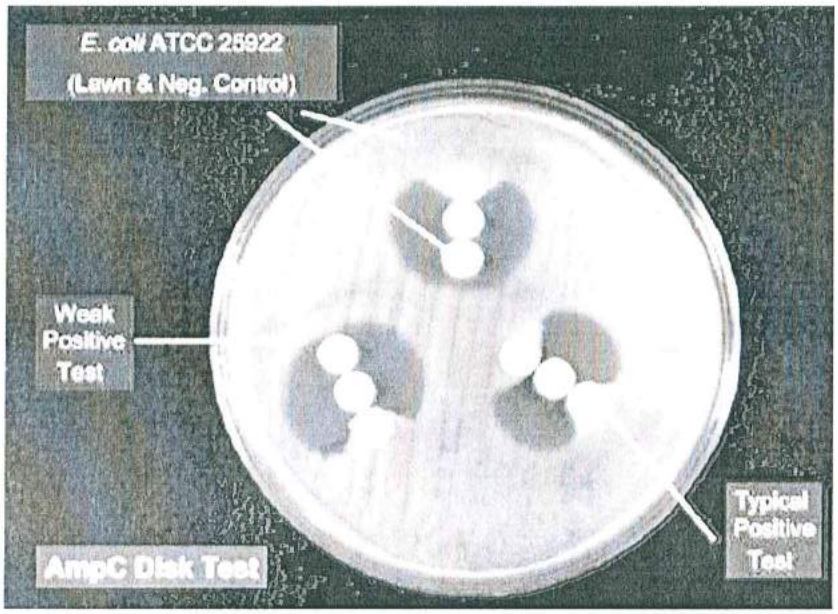
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M. Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE AMP C MEDIADA POR PLASMIDO		
POE N°: 35	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2



REDACCION:
LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE AMP C MEDIADA POR PLASMIDO (TEST TRIDIMENSIONAL)		
POE N°: 36	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la detección de AMP C mediada por plásmido.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepas de *Citrobacter Freundii*, *Enterobacter cloaclae*, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balón, etc.
c) Autoclave
d) Placas con agar Mueller Hinton
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

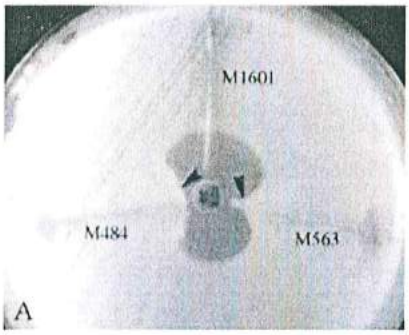
V. PROCEDIMIENTO

Test tridimensional para detección de AmpC mediada por plásmido

Esa prueba ha sido diseñada para la detección de β- lactamasas tipo BLEE y AmpC. Para esta prueba se utiliza un concentrado de células.

La superficie del agar Mueller Hinton es inoculada con la cepa de *E. coli* ATCC 25922, se coloca un disco de cefoxitin de 30µg sobre el agar inoculado. Se hace una hendidura de 5mm sobre el agar desde el borde del disco en forma radial, dentro de la hendidura se coloca el extracto celular de la muestra.

Si se observa un aumento del crecimiento del microorganismo en el punto donde se intercepta la hendidura con la zona de inhibición es considerado un resultado positivo de presencia de AmpC.



Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCION DE AMP C MEDIADA POR PLASMIDO (TEST TRIDIMENSIONAL)		
POE N°: 36	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

REFERENCIAS

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD: METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE CARBAPENEMASAS"TEST DE HODGE MODIFICADO"		
POE N°: 37	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la detección de Carbapenemasas.

II.ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E.

III. MUESTRA

Cepas de bacterias con prueba tamiz sospechosas de tener carbapenemasas.

IV.MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Materiales de Vidrio: Matraz, Probeta, Balón, etc.
c) Autoclave
d) Placas con agar Mueller Hinton
e) Estufa a 35-37°C
f) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V. PROCEDIMIENTO

Prueba tamiz por método de difusión en disco
Discos de meropenem y ertapenem de 10µg
Incubación 35±2°C en aerobiosis por 16-18horas

Sospecha de carbapenemasa: Diámetro del halo meropenem 16-21mm, Diámetro del halo ertapenem 19-21mm
Se debe confirmar con el test de Hodge
No utilizar disco de imipenem porque es pobre predictor de carbapenemasas, Control de calidad: *E. coli* ATCC 25922

Prueba Confirmatoria CLSI

Confirmar con Test de Hodge: Cuando la prueba tamiz es positiva o se presenta resistencia a cefalosporinas como son cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefoperazona y ceftizoxima.
Preparar una suspensión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 al 0.5 McFarland y realizar una dilución 1:10 en solución salina o agua destilada.
Extender el inóculo de la cepa ATCC sobre la superficie del agar Mueller Hinton siguiendo las recomendaciones de CLSI para el método de difusión en disco.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

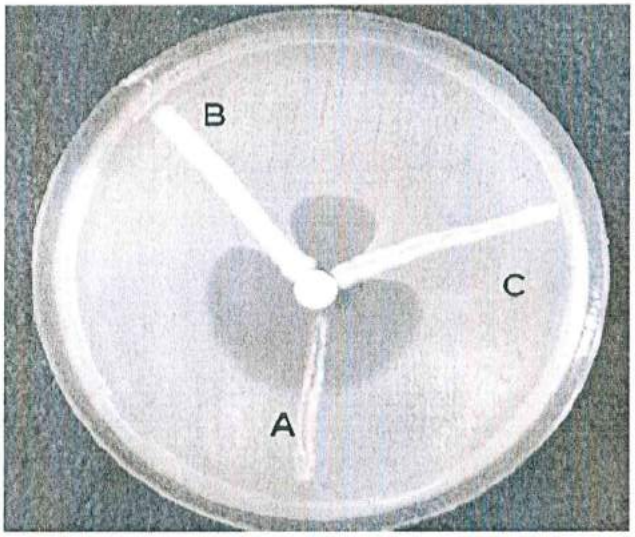
TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD: METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE CARBAPENEMASAS"TEST DE HODGE MODIFICADO"		
POE N°: 37	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

Colocar el disco de ertapenem o meropenem 10µg en el centro de la placa
Tomar de 3 a 5 colonias de un cultivo fresco del microorganismo a probar y realice una estría desde el disco hacia la periferia, que puede tener una profundidad de 20 a 25mm
Incubación 35 ± 2°C en aerobiosis por 16-20 horas.

Resultado positivo: Hendidura en el crecimiento

Control positivo *K.pneumoniae* BAA 1705
Control negativo *K. pneumoniae* BAA 1706

Figura No.3 Test de Hodge Modificado



Laboratorio de Microbiología. Facultad de Medicina .Universidad Nacional de Colombia (Bogotá)

A. Control negativo *E. coli* ATCC 25922 (aislamiento no productor de carbapenemasas)
B. Control positivo K. *pneumoniae* (aislamiento productor de carbapenemasa KPC-3)
C. Aislamiento en estudio *K. pneumoniae* (resultado positivo para producción de carbapenemasa)

REFERENCIAS:

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.

REDACCION:
LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD: METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE CARBAPENEMASAS"TEST DE HODGE MODIFICADO"		
POE N°: 37	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE METALOBETALACTAMASA		
POE N°: 38	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la detección de Metalobetalactamasa.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Cepas de bacterias de Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter spp.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

a) Cabina de bioseguridad.
b) Autoclave
c) Placas con agar Mueller Hinton
d) Estufa a 35-37°C
e) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

Detección de Metalo β-lactamasas por el laboratorio - Prueba de sinergismo

Teniendo en cuenta la capacidad de los quelantes para interactuar con el Zn del sitio activo, muchos ensayos fenotípicos han sido empleados en la detección de MBLs; sin embargo, ningún método ha sido lo suficientemente estandarizado.
Esta técnica se basa en el método de difusión en disco, se realiza una suspensión de la bacteria sobre el Agar Mueller Hinton, se colocan dos discos de imipenem y dos de meropenem de 10µg, se adiciona EDTA sobre uno de los discos de imipenem y de meropenem.

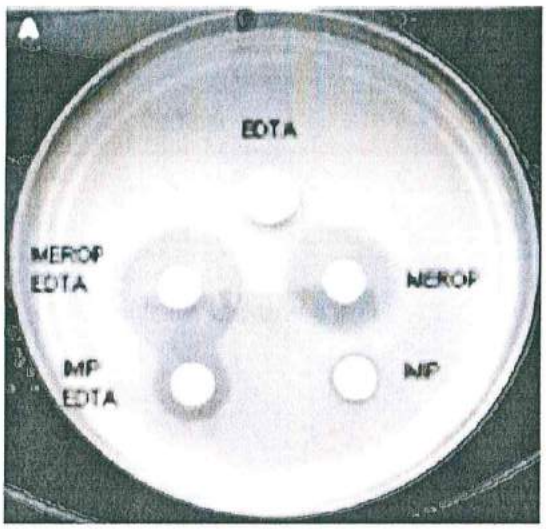
La presencia de una zona sinérgica de inhibición o agrandamiento de diámetro en el halo de inhibición del disco del antibiótico hacia el disco con inhibidores es considerada positiva.
Las pruebas que involucran varios agentes quelantes como EDTA y MPA han tenido una buena sensibilidad debido a que los quelantes son inhibidores específicos de MBLs; no siempre un solo agente quelante puede no inhibir todas las MBLs en ciertos patógenos, haciendo necesario el uso de una mezcla de quelantes para una confiable detección.
Esta técnica ha sido validada con *P. aeruginosa* y *Acinetobacter spp*, mientras que es más limitada para Enterobacterias y bacterias gram negativas.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE METALOBETALACTAMASA		
POE N°: 38	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2



REFERENCIAS

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantia de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE RESISTENCIA INDUCIBLE A CLINDAMICINA		
POE N°: 39	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la deteccion de Resistencia inducible a Clindamicia.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Cepas de bacterias de *Staphilococcus aureus* o *S. Lugduniensis* resitentes a Eritromicina y susceptible o intermedio a Clindamicina.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

a) Cabina de bioseguridad.
b) Autoclave
c) Placas con agar Mueller Hinton
d) Estufa a 35-37°C
e) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

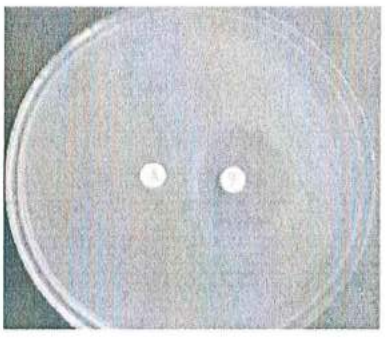
V.PROCEDIMIENTO

Ajustar la concentración bacteriana a un patrón de turbidez del 0.5 McFarland
Realizar la siembra en teja de la cepa a investigar sobre la placa con agar Mueller Hinton
Colocar los discos de Eritromicina 15ug y Clindamicina 2ug separados entre sí de 15 – 26 mm
Incubar la placa inoculada con los discos durante 16-18 horas a 37°C.

Lectura:

Un resultado positivo es evidenciado por un achatamiento en la zona de inhibición adyacente al disco de eritromicina (Zona D) conocido como resistencia inducible a Clindamicina.
También es positivo si el crecimiento no es claro dentro de la zona de inhibición alrededor de la clindamicina, aun si la zona D no aparece.
Reporte: Reportar Aislamiento con resistencia inducible a Clindamicina como clindamicina resistente.

Control de Calidad: *S. aureus* ATCC 25923.



Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE RESISTENCIA INDUCIBLE A CLINDAMICINA		
POE N°: 39	Revisión N° - 01	Fecha de3 aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

REFERENCIAS

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD: METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE RESISTENCIA A PENICILINA EN *STAPHYLOCOCCUS SPP*		
POE N°: 40	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la detección de Resistencia a Penicilina.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Cepas de bacterias de *Staphylococcus spp*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Autoclave
c) Placas con agar Mueller Hinton
d) Estufa a 35-37°C
e) Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton

V.PROCEDIMIENTO

Se recomienda realizar la prueba utilizando el método de difusión en disco en Agar Mueller Hinton, siguiendo las recomendaciones de CLSI, con un disco de penicilina de 10U en vez del disco de ampicilina para Staphylococcus.

Staphylococcus susceptibles a penicilina son también susceptibles a otras penicilinas, combinaciones de inhibidores de β lactámicos, cefems y carbapenemes aprobados por FDA para infecciones por Staphylococcus. Aislamientos resistentes a penicilina y susceptibles a oxacilina son susceptibles a penicilinasa lábil a penicilinas pero resistentes a otras penicilinasa estable a penicilina y combinaciones de inhibidores de β lactámicos cefems y carbapenemes. Staphylococus resistentes a oxacilina son resistentes a los antimicrobianos β lactámicos con la excepción de las nuevas cefalosporinas con actividad anti MRSA. Esta susceptibilidad o resistencia a una amplia variedad de β lactámicos puede ser deducido de la prueba solo con penicilina, o cualquiera de los dos cefoxitin u oxacilina.

Si una penicilinasa estable a penicilina es probada, el agente de elección es la oxacilina y los resultados se pueden aplicar a otras penicilinasas estables como son cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, meticilina y nafcilina.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD: METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE RESISTENCIA A PENICILINA EN *STAPHYLOCOCCUS SPP*		
POE N°: 40	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

CLSI recomienda

Prueba de β-lactamasa inducida puede ser realizado en *Staphylococcus* con una CIM a penicilina ≤0.12µg/mL ó diámetro del halo ≥29 mm antes de reportar el aislamiento como susceptible a penicilina.

Sin embargo la prevalencia de *S.aureus* susceptible a penicilina es baja, aislamientos que son susceptibles a penicilina pueden producir una β lactamasa, que solamente puede ser detectada con una prueba de β lactamasa inducida- Algunos aislamientos ocasionalmente no son detectados con la prueba de β lactamasa inducida.

Para infecciones severas, el laboratorio podría considerar realizar CIM a penicilina y la prueba de β lactamasa inducida en aislamientos del mismo paciente

REFERENCIAS

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PAR DETECCCION DE RESISTENCIA A OXACILINA		
POE N°: 41	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos la detección de Resistencia a oxacilina

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Cepas de bacterias de *Staphilococcus spp*

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Autoclave
c) Placas con agar Mueller Hinton
d) Estufa a 35-37°C

V. PROCEDIMIENTO

Esta prueba se realiza para *S. aureus, S lugdunensis* y *Staphylococcus* coagulasa negativa, para lo cual se utiliza un disco de oxacilina 1µg o un disco de cefoxitin de 30 µg por el método de difusión en disco siguiendo las recomendaciones de CLSI. También se puede realizar utilizando el método de micro dilución en caldo utilizando cefoxitin u oxacilina. Históricamente la resistencia a penicilinasa estable a penicilina ha sido denominada como resistencia a penicilina o resistencia a oxacilina.

La prueba de cefoxitin en disco o en CIM puede ser utilizada para predecir la presencia de mecA que media la resistencia a oxacilina en *S. aureus* y S. lugdunensis. Para Staphylococcus coagulasa negativa a excepción de S. lugdunensis el disco de cefoxitin es el método recomendado para la detección de mecA que media la resistencia a oxacilina. Cefoxitin es utilizado como un sustituto para determinar la resistencia a oxacilina.

La detección del fenotipo de resistencia a meticilina en *S. aureus* no es fácil debido a que no todas las poblaciones expresan resistencia a meticilina. Este fenotipo de expresión de resistencia es llamado "heterorresistente" ó "heterogéneo" y los métodos de detección son difíciles. La expresión de poblaciones heteroresistentes se alcanza con altas concentraciones de sales y bajas temperaturas. Para el método de micro dilución en caldo se suplementa con 2% de NaCl. CLSI recomienda el uso de cefoxitin de 30µg utilizando el método de difusión en disco o el método de micro dilución en caldo.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - V°B°

TITULO: PRUEBA DE SENSIBILIDAD METODO KIRBY BAUER (DISCO DIFUSION) PARA DETECCCION DE RESISTENCIA A OXACILINA		
POE N°: 41	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

CLSI recomienda

Si se utilizan cefoxitin y oxacilina frente a *S. aureus* y *S. lugdunensis* y ambos resultados son resistentes, el microorganismo puede ser reportado como resistente a oxacilina.

Criterios de interpretación para oxacilina pueden sobreponer resistencia en algunos *Staphylococcus* coagulasa negativa, debido a que algunos aislamientos que no son *S. epidermidis* presentan una CIM de oxacilina entre 0.5 a 2µg/mL con ausencia de *mecA*. Para infecciones severas causadas por *Staphylococcus* coagulas negativa y otros que no son *S. epidermidis*, las pruebas para *mecA* ó PBP2a ó disco de cefoxitin pueden ser apropiadas en aislamientos que presenten una CIM de oxacilina entre 0.5 a 2µg/mL

REFERENCIAS

- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100, 28th ed. 2018.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE *Candida albicans*		
POE N°: 42	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir los procedimientos para identificación de *Candida albicans*.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Aislamientos con morfoligia de levaduras.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Cabina de bioseguridad.
b) Autoclave
c) Placas con agar Mueller Hinton
d) Estufa a 35-37°C

V. PROCEDIMIENTO

- **Identificación**:

La coloración GRAM se presenta con morfología de levadura GRAM positivas.
Proceder a realizar la prueba fisiológica de identificación.

- **Tubo germinativo:** Permite diferenciar *Candida albicans* de otras especies; suspender un inóculo de la cepa pura de Candida con 24 horas de desarrollo en 0,5 mL de suero humano o de conejo. Incubar a 35 – 37 °C por 2h y 30 min.

Colocar 2 ó 3 gotas de la suspensión en una lámina portaobjeto y cubrir con lámina cubreobjeto y observar al microscopio con objetivo de 40X

Interpretación:

La prueba es positiva al visualizar una estructura elongada que se origina a partir de la levadura.
Realizar esta prueba empleando cepas controles en paralelo a la cepa en estudio.
Control positivo: *C. albicans.*
Control negativo: C. *glabrata*

* **Desarrollo a 42 °C**

C. albicans y C. dubliniensis tienen comportamiento fisiológico y morfológico similar y la prueba que los va a diferenciar en el laboratorio de microbiología es el desarrollo a 42 °C en agar Sabouraud dextrosa (ASD) con cloranfenicol y Mueller-Hinton.

a. **Preparación del inóculo y siembra**

- Se parte de un cultivo puro con 24 h de incubación a 37 °C.

TITULO: IDENTIFICACION DE *Candida albicans*		
POE N°: 42	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

- Se toma con la punta del asa de siembra la cepa y se la resuspende en un tubo con 5 mL de Solución salina estéril.
- Homogeneizar y ajustar la turbidez a 0,5 en la escala McFarland (equivale a 1x106 – 5x106 UFC/mL). Este inóculo suspendido usarlo inmediatamente.
- Colocar el hisopo dentro del tubo que contiene la suspensión del inóculo. Embeber y rotar contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.
- Sembrar cuidadosamente (sin presionar el hisopo) la placa de Mueller Hinton modificado en tres direcciones, para obtener crecimiento uniforme en toda la superficie de la misma.
- Colocar la placa con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente durante 10-15 min, para que se absorba la humedad. Evitar tiempos más prolongados de secado.
- Colocar inmediatamente el disco de fluconazol (25 µg) y voriconazol (1µg) en placas Petri correspondiente de forma equidistante. Distribuir los discos de modo que queden a 20 mm del borde de la placa, y separados entre sí por 40 mm.
- Dejar la placa con la tapa hacia arriba a temperatura ambiente durante 10 a 15 min antes de ser colocado en la incubadora.
- Colocar la placa invertida en la incubadora a 37 °C durante 24 h.
- Si transcurridas las 24 h de incubación, los halos no son claramente distinguibles, prolongar la incubación 24 h más para dar lugar al crecimiento de especies de desarrollo más lento.

VI. RESULTADOS

- Medir el diámetro del halo externo de la zona de inhibición con una regla o caliper.
- La zona a medir es la definida por las colonias con desarrollo confluyente. Dentro de la zona de inhibición pueden desarrollar colonias con crecimiento inhibido que muestran un diámetro menor al de las colonias externas. Estas colonias deben ser consideradas dentro del halo de inhibición.

VII. INTERPRETACION

Disco	Sensible	S-DD*	Resistente
Fluconazol	>/= 19	15-18	</=14
Voriconazol	>/=17	14-16	</=13

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: IDENTIFICACION DE *Candida albicans*		
POE N°: 42	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

Positivo: *C. albicans*. con desarrollo óptimo
Negativo: *C. dubliniensis* sin desarrollo

Al no ser positivo al tubo germinativo reportar como candida spp o en su defecto enviar al INS para su tipificación correspondiente.

MATERIAL DE REFERENCIA

a. *Candida krusei* ATCC 6258.
b. *Candida parapsilosis* ATCC 22019.
c. *Candida albicans* ATCC 90028.
d. *Candida tropicales* ATCC 750.

REFERENCIAS

- Murray PR, Barón EJ, Pfaller MA, Tenover FC. Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. 7a ed.Washington DC: American Society for Microbiology; 1999. pp 517 – 25.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: EXAMEN DIRECTO CON HDROXIDO DE POTASIO AL 10%		
POE N°: 43	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir el procedimiento para visualización de elementos fúngicos.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Muestras clínicas de piel, uña y cabello.
Secreciones: vaginal, ótica, heridas..

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Microscopio binocular.
b) Mechero Bunsen.
c) Lámina portaobjeto, limpia y desengrasada.
d) Lámina cubreobjetos.
e) Pipeta de transferencia estéril de 2 mL.
f) Frasco color ámbar y con tapa.
g) Asa de siembra.
h) Equipo de protección personal (Bioseguridad).
i) Plumón marcador.
j) Bolsas de bioseguridad para eliminar residuos.
k) Contenedor de plástico para material punzocortante.
l) Hidróxido de potasio al 10% (KOH 10%).
m) Hipoclorito de sodio comercial.

V. PROCEDIMIENTO

- Con un plumón marcador, escribir en el borde de la lámina portaobjeto el código de la muestra clínica a examinar.
- Dispensar una gota del KOH al 10% en el centro de la lámina portaobjeto.
- Esterilizar a la llama el asa de siembra.
- Agregar con el asa de siembra, sobre la gota del KOH 10%, una porción de la muestra clínica a examinar.
- Colocar una laminilla cubreobjetos encima de la preparación y dejar a temperatura ambiente por tres minutos.
- Observar al microscopio con objetivos de 10X y 40X.

VI. RESULTADOS

Negativo: ausencia de elementos fúngicos.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: EXAMEN DIRECTO CON HDROXIDO DE POTASIO AL 10%		
POE N°: 43	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

Positivo: se observa elementos fúngicos y se reporta de la siguiente manera:

- Presencia de hifas hialinas y tabicadas.
- Presencia de levaduras.
- Presencia de hifas y levaduras.

REFERENCIAS

- Susana Zurita Macalupú, Flor Urcia Ausejo. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2017.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: CULTIVO DE HONGOS		
POE N°: 44	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 2

I. OBJETIVO

Describir el procedimiento para cultivo de agente causal de micosis.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiologia clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Muestras clínicas de piel, uña y cabello, liquidos corporales y secreciones.

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Microscopio binocular.
b) Mechero Bunsen.
c) Incubadora a 37 °C ± 0,5 °C
d) Asa de siembra.
e) Tubo de cultivo de 13 x 100mm.
f) Algodón.
g) Plumón marcador.
h) Contenedor para eliminar los residuos.
i) Implementos de protección personal (Bioseguridad).
j) Agar Sabouraud dextrosa (ASD) o Agar papa dextrosa (APD) u otro medio de cultivo especializado.

V. PROCEDIMIENTO

- Procesar las muestras de forma inmediata, preferentemente.
- Sembrar la muestra en cuatro tubos con el medio de cultivo elegido.
- Incubar entre 25 °C a 30 °C entre 7 a 30 días como máximo.

VI. RESULTADOS

A partir de las colonias que han crecido en los tubos con el medio de cultivo elegido, identificar el genero y la especie del hongo ; de manera opcional, enviar las colonias al Instituto Nacional de Salud para su tipificación.

Morfología macroscópica

El color de las colonias presentan, en general, colores claros, desde tonos blanquecinos, verdes, amarillentos a marrón claro o negro.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M. Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS - LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: CULTIVO DE HONGOS		
POE N°: 44	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 2

REFERENCIAS

- Susana Zurita Macalupú, Flor Urcia Ausejo. Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2017.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sectorial - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: EXAMEN PARASITOLOGICO DIRECTO		
POE N°: 45	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir el procedimiento para busqueda, principalmente en muestras frescas, de formas evolutivas móviles de parásitos de tamaño microscópico (trofozoítos, quistes de protozoos: Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Balantidium coli, etc.; así como larvas o huevos de helmintos: Strongyloides stercoralis, Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Trichostrongylus sp., Paragonimus, Fasciola, etc.)

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Heces frescas

IV. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Portaobjetos, limpio y seco
b) Cubreobjetos
c) Aplicadores de madera
d) Solución salina fisiológica (0.85% cloruro de sodio)
e) Solución de Lugol parasitológico.
f) Frasco con desinfectante para descartar material (clorox, fenol, Lugol).

Soluciones:

Suero fisiológico

Cloruro de sodio ..... 8,50 g
Agua destilada ..... 1000 mL

Solución de lugol parasitológico.

Yodo metálico ..... 1,00 g
Yoduro de potasio ..... 2,00 g
Agua destilada ..... 100 mL

Triturar juntos el yodo y yoduro en un mortero, añadir agua poco a poco y mover lentamente hasta su disolución, añadir el resto de agua y conservar en un frasco ámbar.

V. PROCEDIMIENTO

- Identificar el porta-objetos con la muestra a examinar.
- Colocar 1-2 gotas de solución salina en un extremo del porta-objetos y 1-2 gotas solución de Lugol en el otro extremo.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: EXAMEN PARASITOLOGICO DIRECTO		
POE N°: 45	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

- Con un aplicador tomar una muestra de heces y hacer una emulsión uniforme, primero en la gota de solución salina, y luego en la solución de Lugol. Calcular más o menos 1.5-2 mg de heces.
- Cubrir cada preparación con un cubre-objetos.
- Observar, primero con el objetivo de 10X, en forma sistemática toda la preparación en solución salina. Para confirmar estructuras, usar objetivo 40 X cada vez que sea necesario. Anotar hallazgos.
- Proceder de igual manera con la preparación en solución de Lugol, buscando quistes de protozoos para su identificación con magnificación de 10 X y 40 X. Cuando los localice deberá confirmar morfología com objetivo 100 X. Para ello colocar una gota pequeña de aceite de inmersión sobre el cubre-objetos y observar con el objetivo 100 X correspondiente.
- Debe tener práctica para esta modalidad, pero es la única opción para identificar la morfología específica.

VI. RESULTADOS

- En un formato y en el cuaderno de registro correspondiente, se anotará el nombre de la especie del parásito y su estadío evolutivo, indicando la densidad (número de formas parasitarias por campo microscópico.
- Si se encuentran huevos de nematodos transmitidos por contacto con el suelo, ejecutar una cuenta de huevos de cada especie por separado en el caso de infección con dos o más parásitos: Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura o uncinarias del humano, e informar el cada espécie por separado.
- Informar otras estructuras, cuando estén presentes, ya que indican alguna patología: leucocitos, eritrocitos, macrófagos, cristales de Charcot-Leyden. Para diferenciar leucocitos puede utilizar solución azul de metileno alcalino. Para eosinófilos usar solución acuosa de eosina en vez de solución salina.

REFERENCIAS:

- Beltrán Fabián de Estrada. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos. Serie de Normas Técnicas N° 37. 2013.
- Rina Girard de Kaminsky. Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas. 3ra. Edición.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD DIRIS - LIMA ESTE V°B°

TITULO: EXAMEN PARASITOLOGICO DIRECTO		
POE N°: 45	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: EXAMEN PARASITOLÓGICOS MÉTODO DE CONCENTRACIÓN.		
POE N°: 46	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir el procedimiento para busqueda, principalmente en muestras frescas, de formas evolutivas móviles de parásitos de tamaño microscópico, mediante la técnica de Faust: Método de sedimentación y flotación por centrifugación con sulfato de zinc al 33,3% y densidad 1180.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiologia clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Heces frescas

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Gradilla para tubos de ensayo.
b) Tubos de prueba 15 x 150.
c) Tubos de prueba 13 x 100.
d) Láminas portaobjetos.
e) Laminillas cubreobjetos.
f) Embudo pequeño de vidrio.
g) Bajalengua o bagueta.
h) Gasa.
i) Sulfato de zinc 33,3%, densidad 1,180.
j) Solución de lugol parasitológico.

Solución de sulfato de zinc para 1000 ml

Sulfato de zinc ..... 33,30 g
Agua destilada ..... 1000 mL
Mezclar hasta la completa dilución del sulfato de zinc y medir la densidad de la solución, la que debe ser 1 180.

Solución de sulfato de zinc para 250 ml

Sulfato de zinc ..... 8.32 g
Agua destilada ..... 250 mL
Mezclar hasta la completa dilución del sulfato de zinc y medir la densidad de la solución, la que debe ser 1 180.

V. PROCEDIMIENTOS

- Colocar 1 a 2 g de la muestra de heces en el tubo de prueba 13 x 100 o 15 x 150 y agregar de 7 a 10 mL de agua filtrada o destilada. Realizar una buena homogeneización con ayuda del bajalengua o bagueta.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: EXAMEN PARASITOLÓGICOS MÉTODO DE CONCENTRACIÓN.		
POE N°: 46	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

- Colocar en el tubo, un embudo con dos capas de gasa y filtrar la muestra homogeneizada hasta alcanzar 1 cm por debajo del borde del tubo (opcional).
- Retirar el embudo y centrifugar de 2 000 a 2 500 r.p.m. de 2 a 3 minutos (opcional).
- Decantar el sobrenadante, adicionar agua al sedimento, homogeneizar y repetir la centrifugación 1 ó 2 veces, hasta que el sobrenadante se observe limpio.
- Eliminar el sobrenadante y agregar la solución de sulfato de zinc (3-4 mL), homogeneizar y completar con la misma solución hasta 1 cm del borde del tubo.
- Centrifugar de 1 a 2 minutos de 2 000 a 2 500 r.p.m. Colocar el tubo en la gradilla y agregar, con ayuda de un gotero, la solución de sulfato de zinc hasta formar un menisco en la boca del tubo.
- Colocar una laminilla cubreobjeto sobre el menisco y dejar en reposo de 5 a 6 minutos.
- Depositar una gota de solución lugol en la lámina portaobjeto.
- Retirar la laminilla cubreobjeto, colocarla sobre la gota de lugol o con asa de Kolle colocar 3 ó 4 asadas en la lámina y cubrir con una laminilla cubreobjeto y observar al microscopio.

VI. RESULTADO

- Se observan principalmente quistes y huevos de parásitos.
- Informar el nombre y estadio evolutivo encontrado, así como la cantidad de elementos observados por campo.

REFERENCIAS

- Beltrán Fabián de Estrada. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos. Serie de Normas Técnicas N° 37. 2003.
- Rina Girard de Kaminsky. Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas. 3ra. Edición.

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	31/05/2018

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

TITULO: EXAMEN PARASITOLÓGICOS MÉTODO DE CONCENTRACIÓN.		
POE N°: 46	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCIÓN DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: BÚSQUEDA DE HUEVOS DE *Enterobius vermicularis*.		
POE N°: 47	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir el procedimiento para diagnosticar infecciones por *E. vermicularis* mediante el método de la cinta transparente adhesiva.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Cinta adhesiva con posibilidad de encontrar huevos de *E. vermicularis*.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Portaobjetos
b) Bajaenguas o espátula de paleta
c) Cinta transparente adhesiva de 2 cm de ancho
d) Pipeta Pasteur y bulbo o perilla de goma
e) Frasco con desinfectante para descartar material
f) Microscopio.
g) Implementos de protección personal (bioseguridad).

V. PROCEDIMIENTOS

- Colocar una tira de cinta transparente adhesiva sobre un portaobjetos limpio y seco, dejando un extremo doblado por debajo de la lámina y en el otro pegar una etiqueta y escribir la identificación del paciente (Figura 5a).
- La obtención de la muestra se realiza en la noche, 2 a 3 horas después que el paciente (generalmente niños) está dormido, o a la mañana siguiente y sin que se haya realizado el aseo de la región perianal.
- Al momento de tomar la muestra, levantar la cinta suavemente del portaobjetos, tomándola por la parte etiquetada.
- Colocar el portaobjetos sobre un bajalenguas o espátula de paleta y doblar la cinta sobre un extremo de éste, con la parte adhesiva hacia fuera (Figura 5b).
- Con el paciente en decúbito, apartar los glúteos con una mano y apretar la cinta adhesiva firmemente a un lado y otro de los pliegues perianales (Figura 5c).
- Volver a colocar la cinta sobre el portaobjetos y descartar el bajalenguas (Figura 5d).
- La muestra puede transportarse o guardarse protegida, hasta el momento del examen.

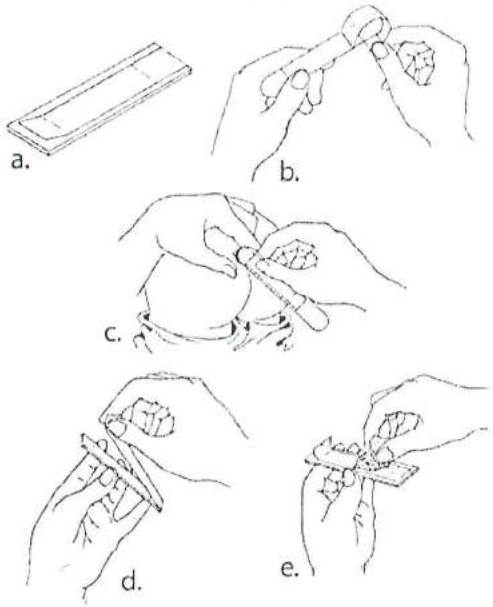
Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Asesoría Jurídica y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: BÚSQUEDA DE HUEVOS DE *Enterobius vermicularis*.		
POE N°: 47	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

FIGURA No. 5



Características morfológicas de los huevos de *Enterobius vermicularis*.

Los huevos de E. vermicularis se observan de cáscara transparente, alargados u ovoides, con un lado más aplanado; tienen un embrión en su interior y miden entre 50-60 µm por 20-30 µm.

REFERENCIAS

- Beltrán Fabián de Estrada. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos. Serie de Normas Técnicas N° 37. 2003.
- Rina Girard de Kaminsky. Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas. 3ra. Edición. 2013

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD DIRIS LIMA ESTE Laboratorio de Salud Pública V°B°

TITULO: BÚSQUEDA DE HUEVOS DE *Enterobius vermicularis.*		
POE N°: 47	Revisión Nº - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

TITULO: COLORACION GIEMSA PARA DIAGNOSTICO DIRECTO EN FROTIS Y GOTA GRUESA		
POE N°: 48	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

I. OBJETIVO

Describir el procedimiento para tinción Giemsa para el diagnostico directo en frotis y gota gruesa, específicamente en Malaria, Bartonelosis y Leishmaniasis.

II. ALCANCE

Debe ser cumplido por el personal del Laboratorio de Microbiología clínica – DIRIS L.E

III. MUESTRA

Frotis de sangre periferica, gota gruesa, frotis de lesiones sospechosas de contener parásitos.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

a) Colorante Giemsa (stock). Ver anexo N° 03.
b) Solución de trabajo (colorante diluido). Ver anexo N° 03.
c) Varillas de vidrio para coloración.
d) Bandeja.
e) Frascos gotero.
f) Papel de filtro.
g) Pinza.
h) Embudo.
i) Reloj o cronometro.
j) Microscopio

V. PROCEDIMIENTOS

1. Fijar el frotis sanguíneo sumergiendo la lámina en un frasco con metanol por tres segundos. Sacarlo y dejar secar o colocar la lámina sobre una varilla de vidrio y cubrir la superficie con metanol y dejar que se evapore por completo.
2. Preparar el colorante diluido o solución de trabajo inmediatamente antes de iniciar la coloración y asegurarse que el volumen preparado sea suficiente para las muestras que se va a colorear (aprox. 1 mL por lámina). Se debe evaluar y ajustar el colorante de trabajo en función al estado y características del colorante madre.
3. Filtrar la solución de trabajo con papel filtro
4. Colocar la varilla de vidrio sobre un lavatorio o recipiente, para facilitar la eliminación de los líquidos usados en la coloración.
5. Se colocan las láminas con los frotis sanguíneos, previamente fijados sobre la varilla, separadas una de otra para poder manipularlas con seguridad.
6. Se cubre la extensión con el colorante de trabajo diluido 1:10 por 15 minutos. (La dilución y el tiempo de coloración se ajusta de acuerdo con las características del colorante preparado).

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Medicina y Gestión Sanitaria

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección de Redes Integradas de Salud - Laboratorio de Salud Pública - V°B°

TITULO: COLORACION GIEMSA PARA DIAGNOSTICO DIRECTO EN FROTIS Y GOTA GRUESA		
POE N°: 48	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 1 de 3

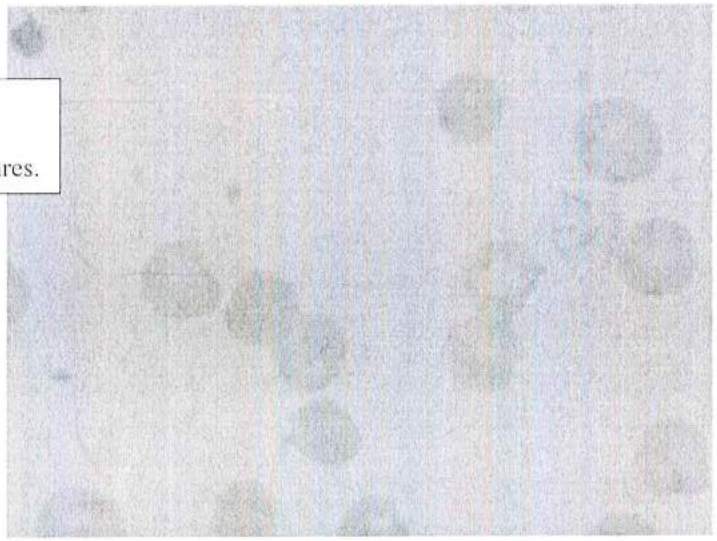
7. Descartar el colorante y lavar la lámina a chorro suave y continuo de agua de caño hasta que arrastre todo exceso de colorante.
8. Colocar las láminas inclinadas en una gradilla para que escurra el agua y dejar secar a temperatura ambiente.
9. Proteger el frotis del polvo.

VI. LECTURA DE LAMINAS

Bartonelosis:

- Se lee de 50 a 100 campos por lámina con la muestra de frotis sanguíneo (objetivo de 100x) con aceite de inmersión, buscando la presencia de formas cocobacilares, bacilares o cocoides que se encuentran dentro de los hematíes.
- Si se observa que las células infectadas son más del 50%, se leerán 50 campos.
- Si se observa que las células infectadas son menos del 50%, se leerán 100 campos.
- Si se observa que el porcentaje de hematíes infectados es menor a 5%, se debe leer toda la lámina.
- En el reporte se debe colocar las formas bacterianas observadas, ya sea bacilar, cocobacilar o cocoide.
- En la fase aguda de la enfermedad se observan predominantemente formas bacilares de color rojizo o violeta, separadas o en grupos dentro de los hematíes; con menos frecuencia se ven formas cocoides.

Frotis sanguíneo con hematíes infectados con formas cocoides y bacilares.



Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - V°B°

TITULO: COLORACION GIEMSA PARA DIAGNOSTICO DIRECTO EN FROTIS Y GOTA GRUESA		
POE N°: 48	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 2 de 3

Malaria:

- Leer las láminas con objetivo 100X y aceite de inmersión.
- El núcleo del parásito (cromatina) es generalmente redondo y se colorea de un rojo intenso (rojo grosella), el citoplasma toma diferentes formas, desde una forma de anillo a una totalmente irregular y se colorea siempre de azul, aunque la tonalidad pueden variar ligeramente.

Examen de la gota gruesa:

- Una lámina puede declararse como negativa, sólo después de observar 100 campos microscópicos sin haber encontrado parásitos. Si se encuentran parásitos, deben examinarse también los 100 campos microscópicos; esto asegura detectar la posibilidad de infección mixta (más de una especie presente en una muestra de sangre).
- Iidentificar la(s) especie(s) a la(s) que pertenecen los parasitos.

Examen del frotis de sangre

Se debe realizar en las siguientes circunstancias:

- Cuando no es posible examinar la gota gruesa por alguna razón (Ejemplo: por ser muy pequeña).
- Cuando no es posible identificar en la gota gruesa la(s) especie(s) de Plasmodium.
- Examinar el mayor número de campos microscópicos (300) para determinar si la muestra de sangre es positiva o negativa para malaria. Si el diagnóstico es dudoso deberá examinar de 400 a 500 campos microscópicos.

Utilizar como guía para determinar los estadios parasitarios de *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae* el Anexo N° 04 de este Manual de procedimientos.

Leishmaniasis:

- Se observan las láminas con objetivo de 100X.
- La observación de formas de amastigotes de Leishmania en los extendidos indica un resultado positivo, debiendo reportar en el resultado de la muestra:

  Leishmania (+): observación de amastigotes de Leishmania.

Nombre de Responsable	Fecha de término de registro
Lic. T.M.Cindy Pinares Diaz	31/05/2018
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA	

MINISTERIO DE SALUD DIRIS - LIMA ESTE V°B°

TITULO: COLORACION GIEMSA PARA DIAGNOSTICO DIRECTO EN FROTIS Y GOTA GRUESA		
POE N°: 48	Revisión N° - 01	Fecha de aplicación: 01-07-2018
	Fecha de Revisión: 20-06-2018	Página: 3 de 3

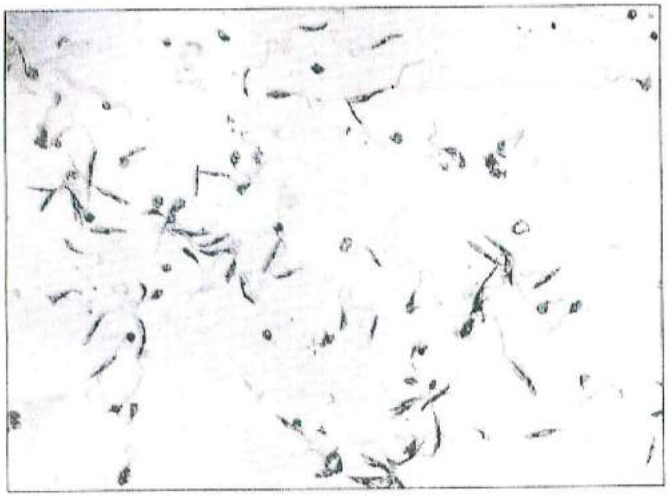


Foto N° 8 : Promastigotes de *Leishmania (V.) braziliensis* coloreados con Giemsa.

REFERENCIAS

REDACCION

LIC. T.M. Cindy Pinares Diaz

APROBACION

AREA	FIRMA	FECHA
Coordinador de Laboratorio Referencial de Salud Pública DIRIS LIMA ESTE	LIC. TM WILDER CHILCA RAMOS	31 MAYO 2018
Garantía de Calidad		

REVISIONES

Laboratorio Referencial de Salud Pública DIIRIS LIMA ESTE	Blgo. GEORGE OBREGON BOLTAN
Garantía de Calidad	

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - V°B°

IX. ANEXOS

ANEXO N° 01

PERÚ Ministerio de Salud — Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este

HALOS DE INHIBICION CLSI 2018 - M100, 28th ed.

ANTIMICROBIANO	SIGLA	POTENCIA µ	RESISTENTE	INTERMEDIO	SUSCEPTIBLE
AMIKACINA	AK	30 µg	≤14 mm	15 - 16	≥17 mm
AMPICILINA	AM	10 µg	≤13 mm (28)S (18)H (16)E (23)Sb	(14 - 16), (19-21)H	≥17 mm (29)S (22)H (17)E (24)Sb
AMPICILINA-SULBACTAM	SAM	10/10 µg	≤11mm (19)H	12 - 14	≥15 mm (20)H
AMOXICILINA	AX	25 µg	≤13 mm		≥17 mm
AMOX- AC.CLAVULANICO	AMC	20/10 µg	≤13 mm (19)S, H	14 - 17	≥18 mm (20)S, H
AMOX-SULBACTAM	SO	10/10 µg	≤13 mm (19)S (19)H		≥18 mm (20)S (20) H
ACIDO NALIDIXICO	W	30 µg	≤13 mm (25)Nm	(14-18)Eb	≥19 mm (26)Nm
ACIDO OXOLINICO	O	2 µg	≤10 mm		≥11 mm
ACIDO PIPEMIDICO	PI	20 µg	≤13 mm		≥19 mm
AZITROMICINA	AZT	15 µg	≤13 mm (11)H (19)Nm	14 - 17	≥18 mm (12)Eb, St,H (26)Nm
AZTREONAM	AZ	30 µg	≤15 mm (17) Eb (25)H	(18-20)Eb, (16-21)P	≥22 mm (21)Eb (26)H
CEFADROXILO	CPH	30 µg	≤14 mm		≥18 mm
CEFACLOR	FAC	30 µg	≤14 mm (16)H	(17-19)H	≥18 mm (20)H
CEFALEXINA	CN	30 µg	≤14 mm		≥18 mm
CEFALOTINA	CF	30 µg	≤14 mm		≥18 mm
CEFAZOLINA	CEZ	30 µg	≤19 mm (14)Inf.Urinarias No complicadas	20 - 22	≥23 mm (18)S (15) Inf.Urin No complicadas
CEFAMANDOL	CMA	30 µg	≤14 mm		≥18 mm
CEFEPIME *	CPM	30 µg	≤18 mm SDD (30)N (25)H (21)Sv(23)Sb(14) Ac	(19 - 24)Eb, (15-17)P	≥25 mm (31)N (26)H (24)Sv,Sb (14)P (18)Ac
CEFIXIMA	CFM	5 µg	≤15 mm (20)H (30)N		≥19 mm (21)H (31)N
CEFOPER-SULBACTAM	SFP	30/75 µg	≤15 mm		≥21mm
CEFOPERAZONA	SFP	75 µg	≤ 15 mm	16 - 20	≥ 21 mm
CEFOTAXIMA	CTX	30 µg	≤14mm (22)Eb (25)Sv,H (30)N (23)Sb (33)Nm	(23 - 25)Eb	≥23mm(26)Eb,H (31)N (24)Sb(28)Sv (34)Nm
CEFOXITINA	CXA	30 µg	≤14 mm (21)S,A.L (23)N (24)Scn	(15-17)Eb (24-27)N	≥18 mm (22)S,A.L (28)N (25)Scn
CEFPROZIL	CPR	30 µg	≤14 mm		≥18 mm
CEFRADINA	CD	30 µg	≤14 mm		≥18 mm
CEFTAZIDIMA	CAZ	30 µg	≤14 mm (17)Eb (25)H (30)N (17)B	(18-20)Eb (15-17)P	≥18 mm (21)Eb,B (26)H (31)N
CEFTRIAXONA	CTR	30 µg	≤13 mm (19)Eb(25)H(24)Sv(23)Sb(34)N(33)Nm	(20 -22)Eb	≥21mm (23)Eb (26)H(27)Sv(24)Sb(35)N(34)Nm
CEFUROXIMA i.v	CXM	30 µg	≤14 mm (16)H (25)N	(15-17)Eb, (17-19)H, (26-30)N	≥18 mm (20)H (31)N
CIPROFLOXACINO	CIP	5 µg	≤15 mm (20)H (27)N (32)Nm (20)St,spp	(15-20)S (28-40)N	≥21mm (21)H (41)N (21)E (35)Nm (31)St,spp
CLARITROMICINA	CLR	15 µg	≤13 mm (10)H (16)S,Sv,Sb	(14 - 17) (11-12)H (17-20)S	≥18 mm (13)H (21)S,Sv,Sb
CLINDAMICINA	Da	2 µg	≤14 mm (15)S,S,Sv,Sb	(15-20)S (16-18)S	≥21mm (19)S,S,Sv,Sb
CLORANFENICOL	C	30 µg	≤12 mm (25)H (20)S (17)Sv,Sb (19)Nm	(13-17) (26-28)H	≥18 mm (29)H (21)S,Sv,Sb (26)Nm
CLOXACILINA	CX	1 µg	≤10 mm		≥13 mm
COLISTIN	CL	10 µg	≤10 mm		≥11mm
DICLOXACILINA	DX	1 µg	≤10 mm , (12)S	(13-15)S	≥13 mm, (16)S
DOXICICLINA	DXS	30 µg	≤10 mm (9)Ac (12)S,E (24)S	(11-13)Eb, (13-15)S,E	≥14 mm (13)Ac (16)S,E (28)S

MINISTERIO DE SALUD - REPÚBLICA DEL PERÚ - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

PERU Ministerio de Salud Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este	DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE LABORATORIO REFERENCIAL DE SALUD PÚBLICA DIRIS LIMA ESTE	LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA CLINICA

ANTIMICROBIANO	SIGLA	POTENCIA µ	RESISTENTE	INTERMEDIO	SUSCEPTIBLE
ENOXACINO	E	10 µg	≤14 mm (31)N		≥18 mm (36)N
ERITROMICINA	EM	15 µg	≤13 mm (15)$,Sv,Sb	(14 - 22) (16-20)$	≥23 mm (21)$,Sv,Sb
ERTAPENEM	ETP	10 µg	≤15 mm (18)Eb (18)H	(19-21)Eb	≥19 mm (22)Eb (19)H
ESTREPTOMICINA	S	10 µg	≤11mm	12 - 14	≥15 mm
ESTREPTOMICINA 300	SE	300 µg	≤6 mm E		≥10 mm E
FLUCLOXACILINA	FX	1 µg	≤10 mm		≥13 mm
FOSFOMICINA	FO	200 µg	≤12 mm	13 - 15	≥16 mm
FURAZOLIDONA	FZ	100 µg	≤14 mm		≥17 mm
GENTAMICINA	GE	10 µg	≤12 mm	13 - 14	≥15 mm
GENTAMICINA 120	G	120 µg	≤ 6 mm E		≥10 mm E
IMIPENEM *	IPM	10 µg	≤13 mm (19)Eb (15)H,P (18)Ac	(20 -22)Eb, (16-18)P	≥16 mm (23)Eb (16)H (19)P (22)Ac
KANAMICINA	K	30 µg	≤13 mm	14 - 17	≥18 mm
LEVOFLOXACINO	LVX	5 µg	≤13 mm (16)H (15)S	(14-16)Eb,E, (16-18)S	≥17 mm (19)S
LINCOMICINA	L	2 µg	≤16 mm		≥21mm
LINEZOLID	LZD	30 µg	≤20 mm S, E	(21-22)E	≥21mm S, $ (23)E
MEROPENEM *	MRP	10 µg	≤13 mm (19)Eb(19)H (15)B (29)Nm (15)P (14)Ac	(20 -22)Eb, (16-18)P	≥16 mm (23)Eb (20)H (20)B (30)Nm (19)P (18)Ac
MICILINAM		10 µg	≤11 mm	12 - 14	≥15 mm
MINOCICLINA	M	30 µg	≤12 mm (25)Nm (14)B,Sm,S,E	(13-16)Eb, (16-18)E	≥16 mm (26)Nm (19)B,Sm,S,E
MOXIFLOXACINO	MXF	5 µg	≤20 mm (S) (17)H (14)S	(21-23)S	≥24 mm (S) (18)H (18)S
NEOMICINA	N	30 µg	≤12 mm		≥17 mm
NITROFURANTOINA	NIT	300 µg	≤14 mm	(13-15)Eb, (16-16)S,E	≥17 mm
NORFLOXACINO	NOR	10 µg	≤12 mm	(13-16)	≥17 mm
OFLOXACINO	FLX	5 µg	≤12 mm (24)N (14)S (15)H	(13-15), (25-30)N	≥16 mm (31)N (18)S (16)H
ONACILINA	OX	1 µg	≤19 mm $ (17)S (17)Sp		≥20 mm $ (18)S (18)Sp
PENICILINA	P	10 U	≤19 mm $ (28)S (26)N (14)E (23)Sb	(27-46)N	≥20 mm $ (29)S (47)N (15)E (24)Sb
PIPERACILINA	PE	100 µg	≤17 mm (14)P	(18 - 20)Eb, (15-20)P	≥21mm
PIPERAC - TAZOBACTAM	TZ	100/10 µg	≤17 mm (14)P	(18 - 20)Eb, (15-20)P	≥21mm H,P (18)S
POLIMIXINA B	PB	300 U	≤11mm		≥12 mm
RIFAMPICINA	R	5 µg	≤16 mm (19)Nm	(17-19)S,E, H (17-18)$	≥20 mm (19)S (25)Nm
ROXITROMICINA	RXT	15 µg	≤13 mm		≥23 mm
SULFATRIMETOPRIM	SXT	25 µg	≤10 mm (15)S (25)Nm	11 - 15	≥16 mm (19)S (30)Nm
SULFONAMIDA	SF	250 µg	≤12 mm		≥17 mm
TEICOPLANINA	TEI	30 µg	≤10 mm	(11-13)E	≥14 mm
TETRACICLINA	Te	30 µg	≤11mm (24)S (30)N (25)H (14)S,E,V (18)Sv,Sb	(26-28)H (12-14)Eb, (15-18)S,E (31-37)N (25-27)$	≥15 mm (28)S (38)N (29)H (19)S,E,V (23)Sv,Sb
TOBRAMICINA	TB	10 µg	≤12 mm	13 - 14 mm	≥15 mm
TRIMETOPRIM	TMP	5 µg	≤10 mm	(11-15)Eb,S	≥16 mm
VANCOMICINA	VA	30 µg	≤16 mm (14)E	(15-16)E	≥17 mm $,E,Sb

LEYENDA:

- **(S)** Staphylococcus spp.
- (Scn) Staphy.coagulasa-negativa
- **(A)** Staphylococcus aureus
- **(St)** Salmonella typhi,extra intestinal spp
- **($)** Streptococcus pneumoniae
- **(P)** Ps. Aeruginosa
- (L) S. lugdunensis
- (Ac) Acinetobacter spp.
- (Sm) S. maltophilia
- (Eb) Enterobacteriaceae
- (E) Enterococcus spp.
- (H) Haemophilus spp.
- (Sv) Strept.viridans
- (Sb) Strept. Beta hemoliticus
- (B) B. cepacia
- (N) N. gonorrhoeae
- (Nm) N. meningitidis
- (V) Vibrio cholerae
- (Sp) S. pseudintermedius

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - DIRIS LIMA ESTE - 161

MINISTERIO DE SALUD - DIRECCION DE REDES INTEGRADAS DE SALUD LIMA ESTE - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

ANEXO N° 02

Elección del método de toma de muestra para infección micotica

MATERIAL	LESIONES	SOSPECHA	TOMA DE MUESTRA
PIEL	Multiples manchas descamativas color pardo o mas claras que el color de la piel normal. Generalmente localizadas en el tronco, raramente en cara, cuello, brazos, axilas o muslos. Presentan fluosrescencia desde rojiza a amarilla anaranjada con luz de Wood.	Pitiriasis versicolor	Cinta ahesiva transparente
	Lesiones humedas con alteracion de la epidermis, que provocan pruruti y ardor, localizadas en pequeños y grandes pliegues.	Candidiasis	Raspado y/o hisopado
	Manchas negras o pardas, unicas o no, localizadas especialmente en la palma de las manos, planta de los pies y raramente en otras zonas del cuerpo.	Tinea negra	Raspado
	Lesiones inflamatorias con alteraciones de la epidermis (vesiculas, descamación) y/o de la dermis (eritema, edema, supuración); generalmente bordes bien definidos, anulares o policiclicos elevados, con área central escamosa y periferie eritematosa que avanza activamente con o sin vesicula, localizadas en cualquier área del cuerpo o de la cara.	Tinea corporis Tinea cruris	Raspado del borde activo. Si se observa inflamación de los folículos pilosos se tomará muestra del vello por depilación.
	Lesiones localizadas en los pliegues interdigitales, en la planta y/o dorso del pie, consistentes en fisuras de la membrana interdigital de color rojo y bordes blancos, o lesiones hiperqueratosicas pápuloescamosas con escamas furfuráceas que asientan sobre una base engrosada y eritematosa de planta o dorso del pie, con o sin vesícula o pústulas.	Tinea pedis	Raspado de la periferie de la lesión.
UÑAS	Uñas endurecidas, engrosadas o no, con surcos, con o sin cambio de color pero con brillo. Sin formación de residuos epidermicos entre la uña y su lecho. Habitualmente con perionixis inflamatoria, rojiza y dolorosa.	Onixis por levaduras	Raspado. No descontaminar con alcohol antes de recolectar material para cultivo.
	Uñas endurecidas, engrosadas, con o sin surcos, pero siempre friables y quebradizas, con pérdida de color y brillo natural. Hay formación de detritos epidérmicos caseosos entre la uña y su lecho. La infección generalmente comienza por el borde lateral o distal de la uña. No hay perionixis.	Tinea unguium	Raspado, recoger el material caseoso

MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

ANEXO N° 03
PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y COLORANTE GIEMSA

1. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN ALCOHÓLICA GIEMSA (solución madre)

Fórmula:
Colorante Giemsa en polvo, certificado..... 0,75 g
Alcohol metílico puro..... 65 mL
Glicerina pura..... 35 mL

Preparación:

- A un frasco de vidrio de color ámbar conteniendo perlas de vidrio de diámetro no mayor de 5 mm, se agrega la glicerina; luego se adiciona el colorante Giemsa, se va agitando. Finalmente, se adiciona el alcohol metílico.
- Agitar el frasco intensamente varias veces al día, durante tres días como mínimo.
- Extraer diariamente una pequeña muestra del colorante preparado, filtrarla a través de papel filtro # 2, y probar con frotis sanguíneos recién preparados.
- Cuando los elementos de la sangre aparezcan con sus colores apropiados, entonces el colorante está listo para ser utilizado.

2. PREPARACIÓN DEL DILUYENTE (solución amortiguadora)

El diluyente es una solución amortiguadora y se usa en la preparación del colorante diluido o solución de trabajo. Las sustancias amortiguadoras actúan como un adaptador que inactiva dentro de un margen limitado cantidades variables de ácido o álcali.

Fórmula:
Ortofosfato disodico anhidro (Na_2HPO_4).... 4 g
Ortofosfato monopotásico (KH_2PO_4)..... 5 g

Preparación:
Mezclar bien, y disolver 1g de la mezcla en un litro de agua destilada y ajustar el pH a 7,2.

3. PREPARACIÓN DEL COLORANTE DILUIDO O SOLUCIÓN DE TRABAJO

Fórmula:
Solución madre Giemsa..... 0,05 mL
Solución amortiguadora o diluyente..... 0,95 mL

Preparación:

- En una probeta de vidrio se añade la solución madre Giemsa al 5% con la solución amortiguadora.
- Una forma más rápida de preparar el colorante diluido es agregando una gota de solución madre por mL de solución amortiguadora.
- Después de preparado el colorante madre, se debe determinar el tiempo de coloración que puede ser entre 15 - 20 minutos y la dilución en la que se debe preparar el colorante diluido, estas dos características se deben ajustar en función al estado del colorante madre.

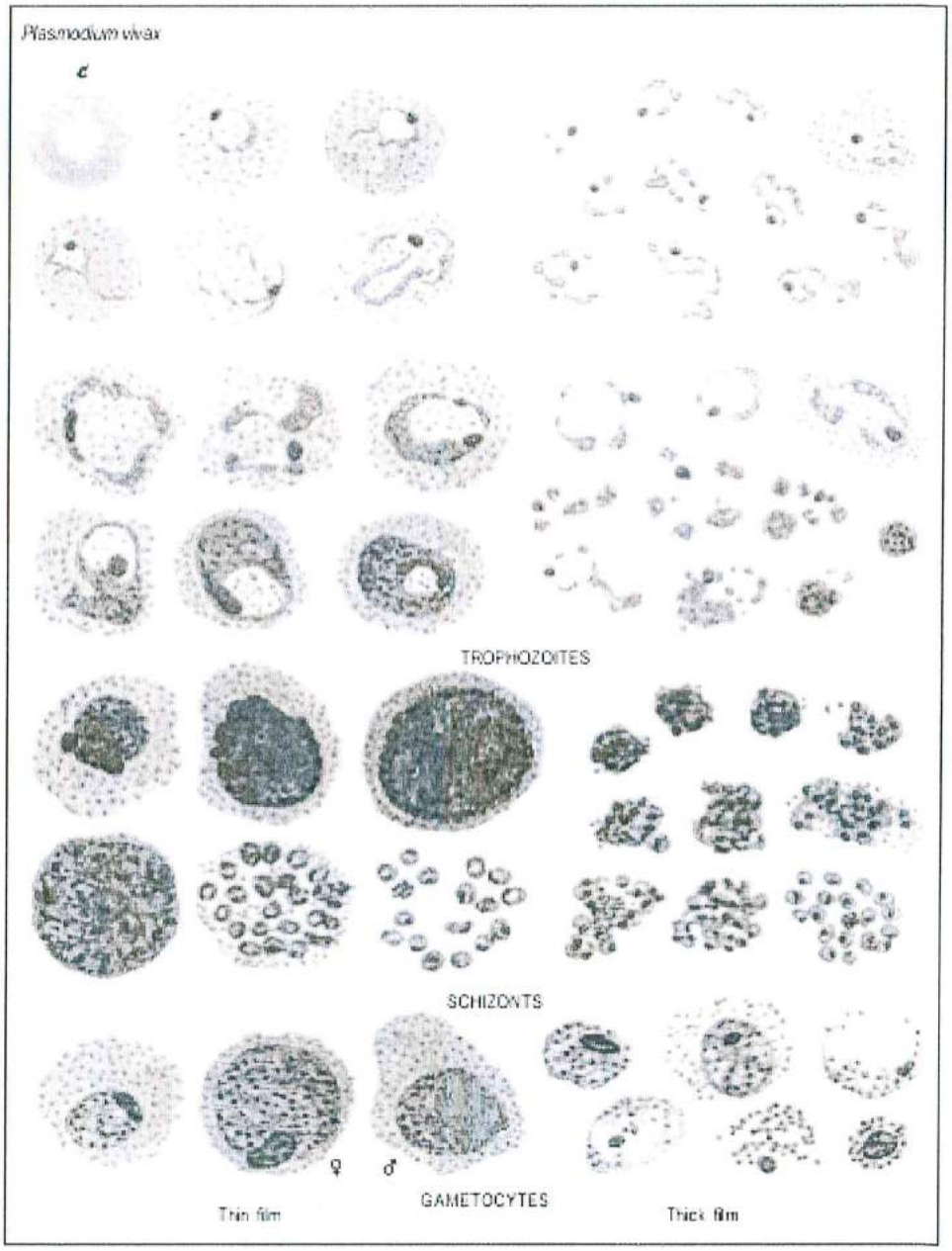
MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE

ANEXO N° 04

ESTADIOS PARASITARIOS DE *Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae*

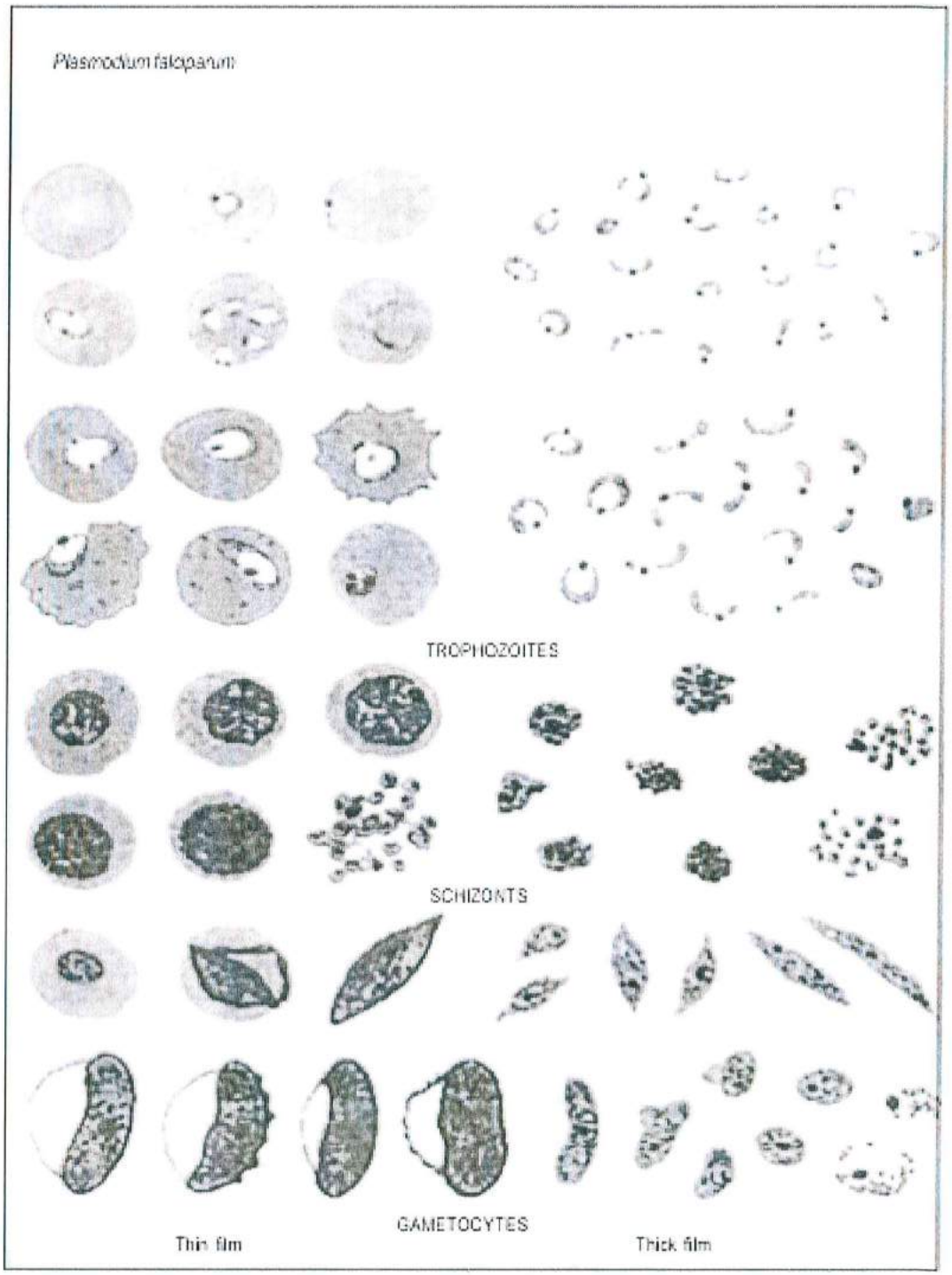
ESTADIOS PARASITARIOS DE *P. vivax* EN FROTIS (IZQ)
Y GOTA GRUESA (DER.)



MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD DIRIS - LIMA ESTE V°B°

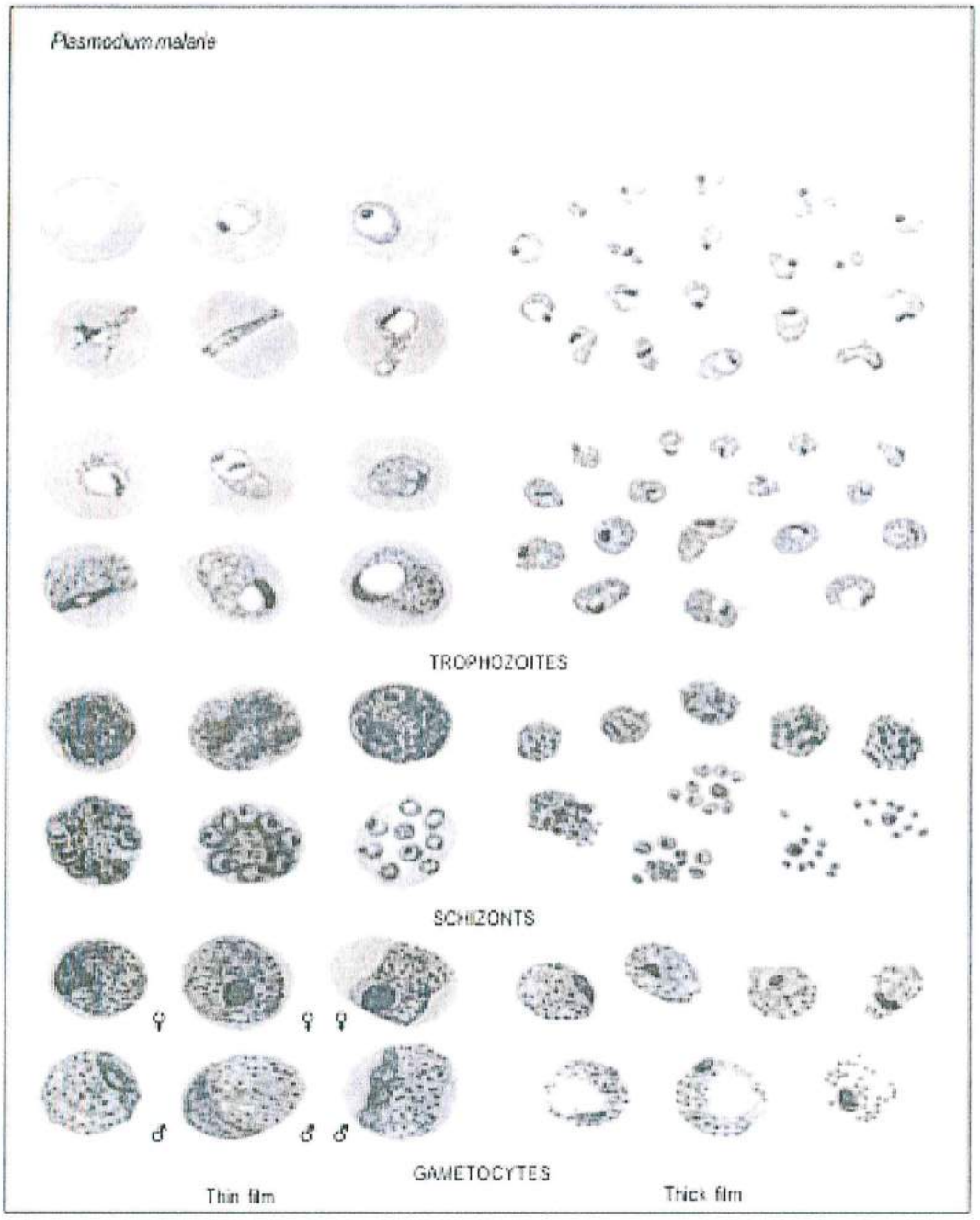
ESTADIOS PARASITARIOS DE *P. falciparum* EN FROTIS (IZQ) Y GOTA GRUESA (DER.)



MINISTERIO DE SALUD - REPUBLICA DEL PERU - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - DIRIS LIMA ESTE

MINISTERIO DE SALUD - Dirección de Redes Integradas de Salud Lima Este - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS LIMA ESTE

ESTADIOS PARASITARIOS DE *P. malariae* EN FROTIS (IZQ) Y GOTA GRUESA (DER.)



MINISTERIO DE SALUD - DIRIS LIMA ESTE - Dirección Ejecutiva de Monitoreo y Gestión Sanitaria - REPUBLICA DEL PERU

MINISTERIO DE SALUD - Laboratorio de Salud Pública - V°B° - DIRIS - LIMA ESTE