

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA BIOQUIMICA



**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TECNICOS E INTERPRETATIVOS EN
UROCULTIVOS PARA EL LABORATORIO, ESPECIALIDADES EL ALTO C.N.S**

TRABAJO DIRIGIDO PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

POSTULANTE:

RIVERO ESCOBAR CAROLA DOMY

ASESORES:

DRA. WILMA TELLEZ. CASTELLON

DRA. NELLY FERNANDEZ SANCHEZ.

LA PAZ - BOLIVIA

2005

RESUMEN

El presente trabajo lleva como título ***“MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TECNICOS E INTERPRETATIVOS EN UROCULTIVOS PARA EL LABORATORIO, ESPECIALIDADES EL- ALTO. CNS”***. El cual pone a consideración una parte experimental como precedente de la metodología actual, con el fin de alcanzar la uniformidad de los procedimientos técnicos e interpretativos de dicho examen, siguiendo las normas establecidas por el Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica dependiente del Instituto Nacional de Laboratorio en Salud. – INLASA -, reuniendo las condiciones básicas para lograr claridad, objetividad, actualización y orden en las distintas fases que comprende un examen de Urocultivo. A la vez dotándole de calidad a los reportes que salen de Laboratorio y de esta manera poder ofrecer al paciente un servicio de buena calidad, dando una solución adecuada a problemas de salud, colaborando con los médicos y otros profesionales de área.

En este manual, el lector encuentra reunida bases bioquímicas, medios y reactivos empleados, su preparación además toda la información que se refiere al procesamiento, conservación de la muestra, seleccionando las pruebas bioquímicas que se realizan con mayor frecuencia, su principio, fundamento Y un control de calidad de las respectivas pruebas y su interpretación.

Con seguridad que el buen uso de este manual redundará en una mejor atención a los pacientes y naturalmente condicionará un seguro progreso y beneficio en el ejercicio de nuestra profesión.

TABLA DE CONTENIDO TRABAJO EXPERIMENTAL

ETAPA I.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Antecedentes generales sobre el problema en estudio.....	2
2.1.1 Antecedentes de Infecciones Urinarias.....	3
2.1.2. Definición.....	4
2.1.3 Orientación Diagnostica de Infecciones del tracto urinario.....	4
2.1.4. Etiología Bacteriológica de las Infecciones Urinarias.....	9
2.1.5 Antibióticos utilizados en Infecciones del tracto urinario.....	9
3. JUSTIFICACION.....	12
4. OBJETIVOS.....	13
4.1 Objetivo General.....	13
4.2 Objetivos Específicos.....	13
5. MATERIALES Y METODOS.....	13
5.1 METODOS.....	13
5.2 EQUIPOS Y REACTIVOS.....	14
5.3 PROCEDIMIENTO PREVIO AL CULTIVO.....	15
5.3.1 Recolección de la Toma de Muestra.....	15
5.3.2 Transporte Y conservación de la Muestra.....	16
5.3.3 Recepción y Procesamiento de la Muestra.....	17
5.3.4 Variables del sedimento urinario	17

5.3.5 Cultivo urinario de acuerdo a la observación previa del sedimento.....	18
6. DETERMINACIÓN DEL CALIBRE DEL ASA BACTERIOLÓGICA.....	18
6.1 Método Colorimétrico.....	18
6.2. Método Gravimétrico.....	19
7. MÉTODO DE SIEMBRA.....	20
7.1 Método del asa calibrada.....	20
7.2 Método Estándar asa de Drigalsky.....	20
8. CULTIVO.....	21
8.1 Cultivo Cuantitativo.....	21
8.2 Evaluación de los medios de cultivo.....	21
8.3 Incubación.....	21
8.3.1 Atmósfera.....	21
8.3.2 Temperatura.....	21
8.3.3 Tiempo.....	22
8.4 Interpretación del recuento bacteriano.....	22
8.5 Identificación del agente patógeno.....	22
9. RESULTADOS	23
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	27
11. BIBLIOGRAFIA.....	29

“MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA UROCULTIVOS”

INTRODUCCION

El procesamiento del Urocultivo, exige el conocimiento previo de ciertos datos concernientes a la muestra y al paciente. Por otra parte el informe final de un resultado correcto no puede llevarse a cabo sin un análisis exhaustivo, el cual demanda la transferencia e integración de conceptos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos previamente adquiridos y debidamente actualizados.

La Fase pre- analítica, Fase analítica, y Fase post- analítica, implican aspectos de minuciosa atención y cuidado con el fin de minimizar al máximo los errores factibles de ser cometidos en la practica diaria para garantizar el resultado del examen practicado.

El problema que atraviesan la mayoría de los policlínicos (CNS), en el área de bacteriología para la realización de urocultivos, en el diagnostico microbiológico de una infección urinaria, es la falta de actualización en la metodología y criterios de diagnostico, que deben ser cumplidos y aplicados sobre las bases de normas éticas y técnicas establecidas como referencia para el procesamiento e interpretación de dicho examen; sino mas bien se basan en la experiencia adquirida a través de los años de trabajo, dejando de lado las actuales técnicas en la manipulación del diagnostico definitivo, dando como resultado la falta de uniformidad. Esto no supone una imposibilidad de diagnostico aunque su fiabilidad se reduce drásticamente.

Aspectos como la correcta obtención de la muestra, el tiempo transcurrido entre la recolección de la muestra y su siembra, la determinación del calibre del asa bacteriológica, son esenciales para obtener recuentos fidedignos. Del mismo

modo la elección del medio de cultivo debe ser la opción que permita la recuperación de la mayoría de los patógenos, tanto como para su desarrollo como para su caracterización, las pruebas bioquímicas deben realizarse secuencialmente con conocimiento de los principios, bases bioquímicas, los métodos de interpretación y precauciones que hay que observar con cada una de las pruebas. Otro aspecto importante es la elección de los antibióticos, dato que resulta esencial para la orientación del médico tratante en el proceso infeccioso.

Esto es particularmente importante, pues redundando en diagnósticos acertados, mejora la calidad en términos de certeza y favorece el manejo adecuado y oportuno del los pacientes.

El presente trabajo pone a consideración una parte experimental como precedente de la metodología actual, con el fin de alcanzar la uniformidad de los procedimientos técnicos e interpretativos de dicho examen, siguiendo las normas establecidas por el Laboratorio Nacional de Referencia en Bacteriología Clínica dependiente del Instituto Nacional de Laboratorio en Salud. – INLASA -, reuniendo las condiciones básicas para lograr claridad, objetividad, actualización y orden en las distintas fases que comprende un examen de Urocultivo. A la vez dotándole de calidad a los reportes que salen de Laboratorio y de esta manera poder ofrecer al paciente un servicio de buena calidad, dando una solución adecuada a problemas de salud, colaborando con los médicos y otros profesionales de área.

2. ANTECEDENTES

2.1. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA EN ESTUDIO.

El estudio empírico de las infecciones urinarias a través de análisis de orina se remota a la época 2 del nacimiento de la microbiología, ya que la ausencia de

bacterias de orina normal fue descrita por Luis Pasteur en 1863 al comunicar los resultados de los experimentos relativos de la generación espontánea. Pasteur señaló como una acotación que si bien la orina es estéril en condiciones normales puede ser un excelente medio de cultivo para numerosos microorganismos. Esta aseveración fue comprobada con posterioridad por Kass.

Desde 1956 se han seguido los criterios expuestos por Kass, el cual comprobó que el 95% de los casos de pielonefritis estudiadas poseían recuentos superiores a 100.000 ufc/ml y que posteriores casos de contaminación no llegaban a los 10.000 ufc/ml.

Hay multitud de estudios que indican que la mayoría de las veces, la bacteriuria se manifiesta con recuentos superiores al 1000.000 bac/ml y los límites aceptados en los estudios de la parte media de micción matinal en adultos y niños son los siguientes: recuentos inferiores o iguales a 10.000 se considera como probable contaminación, cifras entre 10.000 y 100.000 es dudoso y se debe repetir el estudio, recuentos superiores o iguales a 100.000 corresponden a una probable infección.

2.1.1. ANTECEDENTES DE INFECCIONES URINARIAS.

Las infecciones urinarias son un motivo frecuente de consulta médica en la atención primaria. Esto hace que muchas veces deba comenzarse un tratamiento antibiótico en forma empírica hasta obtener los resultados de estudios microbiólogos.

Los gérmenes causantes de estos procesos son en su gran mayoría Bacilos Gram. negativos, los cuales poseen una gran plasticidad genética para expresar y

adquirir determinantes de resistencia a los antimicrobianos planteando un desafío al clínico.

La recurrencia de infecciones bajas en mujeres jóvenes, así como la elección de antibióticos seguros en embarazadas son otros de los tópicos que destacan la importancia del uso racional de los antibióticos en los planes terapéuticos de las infecciones urinarias.

2.1.2 DEFINICION.

El Urocultivo es el cultivo de orina para diagnosticar infección sintomática del tracto urinario o infección asintomático (Bacteriuria Asintomática), en pacientes con riesgo de infección. Esta basada en la presencia de un número significativo de bacterias (generalmente. ≥ 100.000 bacterias /ml), la piuria junto con la bacteriuria, es un dato muy importante para el diagnóstico de infección del tracto urinario, ya que prácticamente esta presente en todas las infecciones urinarias. Una excepción es la bacteriuria asintomática en la que la piuria puede estar ausente.

2.1.3 ORIENTACION DIAGNOSTICA DE I.T.U.

El laboratorio permite analizar la composición de la orina y de la sangre del paciente, así como efectuar pruebas de:

a. ANALISIS DE ORINA. El análisis de orina incluye proteinuria, sedimento urinario y cultivo de orina. Además, se pueden investigar el pH y la densidad urinaria, así como la excreción de numerosos solutos

(Glucosa, cuerpos cetónicos, urea, creatinina, sodio y potasio, entre otros).

b. SEDIMENTO URINARIO. El examen del sedimento de orina es un procedimiento diagnóstico sencillo y valioso. Se efectúa tras la obtención de una muestra de orina reciente o conservada en medio ácido a 4 °C, de la cual se

centrifugan 10 ml a 2.000 rpm durante 5 min. y se desechan los 9 ml del sobrenadante. En un individuo sano, la orina contiene menos de 3 hematíes/campo, menos de 5 leucocitos/campo y algunos cilindros hialinos, células epiteliales y cristales. Cuando el recuento se expresa por minuto, los individuos normales excretan menos de 2.000 hematíes y de 5.000 leucocitos por minuto.

La hematuria macroscópica es fácil de reconocer y constituye un motivo frecuente de consulta, pero la presencia de sangre en la orina siempre debe confirmarse con el examen del sedimento urinario. El resultado de las tiras reactivas es positivo si existe hemoglobina en la orina, ya sea porque hay hematíes (hematuria) o porque hay hemoglobina libre (hemoglobinuria).

La mioglobina puede también dar una reacción positiva. La hematuria microscópica es un hallazgo de laboratorio, que puede presentarse aislado o junto a otras alteraciones puede tener su origen en cualquier nivel del aparato urinario, desde el glomérulo renal hasta la uretra anterior. Incluye causas tan diversas como tumores, cálculos, quistes, traumatismos, cuerpos extraños, infecciones, alteraciones de la coagulación o inflamaciones del parénquima renal.. El hallazgo de proteinuria significativa (superior a 1 g / 24 h), cilindros hemáticos o hematíes dismórficos, indica que la hematuria es de origen glomerular.

Los hematíes dismórficos, con diferentes tamaños, formas y contenido en hemoglobina, son fáciles de reconocer con el microscopio de contraste de fases.

d. LEUCOCITURIA. Es el hallazgo de un número anormalmente elevado de leucocitos en el sedimento de orina (más de 5 leucocitos/campo). Este término es preferible al de piuria, que tiende a asociar la presencia de

leucocitos con infección urinaria. Aunque, de hecho la leucocituria se debe, en la mayoría de los casos, a una infección aguda o crónica del tracto urinario (uretritis, cistitis, prostatitis, pielonefritis.)

e. URINOCULTIVO. La demostración de gérmenes patógenos y su identificación requiere la práctica de un cultivo de orina en condiciones apropiadas. La orina debe recogerse con la máxima asepsia en un recipiente estéril, tomando una muestra durante la mitad de la micción. La muestra debe transportarse de inmediato al laboratorio o conservarse el menor tiempo posible a baja temperatura. A continuación se siembra en un medio adecuado y se mantiene a 37 °C durante 24 h.

El laboratorio de bacteriología procede entonces a efectuar el recuento del número de unidades formadoras de colonias (UFC) que crecen por mililitro de orina sembrada (urocultivo Cuantitativo) y la identificación del germen (urocultivo cualitativo).

Se acepta en general, que un número superior a 100.000 ufc/ml significa una probabilidad muy alta de infección urinaria.

El examen debe repetirse en un número inferior a 10.000 UFC/mL, representa una contaminación accidental de la muestra. Recientemente se ha demostrado, sin embargo, que existen infecciones de orina verdaderas que cursan con un número bajo de colonias (incluso inferior a 1.000 UFC/mL), en particular si se acompañan de más de 5 leucocitos/campo.

En la mayoría de los casos el germen es único, pero existen infecciones urinarias polimicrobianas. El germen aislado con mayor frecuencia es ***Escherichia coli***, sobre todo en pacientes ambulatorios y sin anomalías en la vía urinaria. En

individuos con litiasis es frecuente la infección por *Proteus* y en pacientes hospitalizados la infección puede estar causada por *Klebsiella*, *Enterobacter* o *Pseudomonas aeruginosa*. Mucho menos frecuentes son las infecciones por gérmenes grampositivos, como *Staphylococcus aureus*, aislado en pacientes con bacteriemia estafilocócica. Recientemente se ha demostrado el carácter patógeno del *Staphylococcus saprophyticus*, un germen considerado banal hasta ahora. En los portadores de sonda vesical permanente, se aísla *Candida albicans* con bastante frecuencia. El hallazgo de otros microorganismos en el aparato urinario, como *Mycobacterium tuberculosis* o diferentes tipos de hongos, protozoos y virus, requiere procedimientos específicos.

f OTROS ANALISIS DE ORINA

El *pH urinario* varía entre límites muy amplios pero, en condiciones normales, la orina suele ser ácida y con un pH inferior a 6,5 ya que debe eliminar la producción diaria de ácidos no volátiles. La utilidad de una medida aislada del pH de orina es, sin embargo, muy limitada, excepto que se relacione con el estado ácido-básico de la sangre. La capacidad renal de acidificación urinaria se explora mediante pruebas de sobrecarga. La *densidad* urinaria es un método sencillo, aunque inexacto, para estimar la concentración total de solutos en una muestra de orina, ya que su medida puede sobrevalorarse cuando la orina contiene cantidades elevadas de glucosa, proteínas o contrastes radiológicos. Por estas razones, es preferible la determinación de la *osmolaridad* urinaria, que se efectúa con la ayuda de un osmómetro (descenso del punto crioscópico). La osmolaridad de la orina varía entre 40 y 1.200 mosm/kg y refleja la capacidad renal para concentrar y diluir

la orina; no obstante, para obtener una medida rigurosa de esta capacidad se requiere efectuar la prueba de concentración y dilución.

La presencia de **glucosa** en la orina en cantidades superiores a 20 mg/dL es siempre anormal y suele deberse a hiperglucemia, aunque a veces es consecuencia de un descenso del umbral de reabsorción (glucosuria normoglucémica). El hallazgo de *cuerpos cetónicos* (cetonuria) es indicativo de acidosis diabética y se investiga con tiras reactivas. La presencia de aminoácidos en la orina en cantidades significativas (aminoaciduria) es patológica y debe investigarse con la reacción de Brand.

El *ionograma* urinario proporciona información acerca de la concentración de sodio, cloro y potasio en la orina y, cuando se conoce el volumen de la diuresis, permite calcular. Las cantidades diarias excretadas. En condiciones normales, la excreción urinaria de estos iones refleja fielmente los aportes de la dieta y sus variaciones. Esta información puede ser de utilidad diagnóstica si se relaciona con las concentraciones plasmáticas y el balance del organismo, pero su determinación aislada rara vez tiene interés. En condiciones normales, la excreción urinaria de sodio en un adulto oscila entre 100 y 200 mEq/24 h y la de potasio entre 50 y 100 mEq/24 h. La determinación de calcio, fósforo, magnesio, ácido úrico y oxalatos forma parte de la exploración del enfermo con litiasis renal. Finalmente, la excreción de urea, creatinina y otros productos finales del metabolismo nitrogenado sólo tienen utilidad si se relacionan con los valores plasmáticos de estas mismas sustancias, lo que constituye el fundamento de diversas pruebas funcionales.(Análisis de sangre)..

2.1.4 ETIOLOGIA BACTERIANA DE LAS INFECCIONES URINARIAS.

La infección urinaria, generalmente es monomicrobiana. El germen más frecuente es *Escherichia coli* (85%), seguido de *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* (en mujer gestante anciano y diabetico),.

Con menos frecuencia es causada por otras enterobacterias , *Pseudomonas aeruginosa* , *Enterococcus spp.* O germen no bacterianos como especies de *Chlamydia* y *Mycoplasma*.

Staphylococcus saprophyticus, es un agente relativamente frecuente de I.U baja en la mujer con vida sexual activa.

Staphylococcus aureus puede observarse en pacientes con sonda vesical o en infección urinaria hematógica, *Staphylococcus epidermidis* se considera como un contaminante de la piel y rara vez causa I.U.C

Hasta en 15% de personas con síntomas de I.U. no se aísla germen en el urocultivo..

2.1.5 ANTIBIOTICOS UTILIZADOS EN I.T.U.

a. QUINOLONAS.

El **ácido pipemidico** integra la primera generación de quinolonas y es útil para el tratamiento de infección urinaria bajas. Las muy activos contra enterobacterias y otros bacilos gram negativos.

Ciprofloxacina es la mas activa contra *P. aeruginosa* .Tienen buena actividad contra *Staphylococcus spp* ; aunque son poco activos frente a otros cocos Gram. positivos .

Adquieren buena concentración en los tejidos, incluyendo próstata y penetran dentro de las células. Su buena absorción digestiva permite administrarlos por vía dérmica

Una vez obtenida la mejoría por V.I . **Norfloxacin** se prefiere para I.U bajas

porque adquiere buena concentración en orina , aunque baja en sangre y es de menor costo que ciprofloxacina . Las quinolonas son eventualmente utilizadas en la mujer gestante, después del 2º trimestre, cuando lo exige la resistencia del germen a los betalactámicos.

b. AMINOGLUCOCIDOS.

Son antibióticos bactericidas, especialmente activos frente a bacilos gramnegativos. Se los puede usar en monoterapia para tratar I.U. Potencian a las aminopenicilinas cuando se tratan infecciones por *Enterococcus* spp. Se los usa durante breves periodos por sus potenciales efectos tóxicos, especialmente durante el embarazo. Cuando se administra la dosis diaria total en una sola vez aumenta su eficacia y disminuye su toxicidad, a la vez de verse facilitada su administración.

c. AMINOPENICILINAS / INHIBIDORES DE LA BETALACTAMASA. (IBL)

Aunque pueden ser útiles contra enterobacilos (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* spp), el nivel de cepas resistentes no permite usarlos en forma empírica, sino después conocida la sensibilidad del germen. Son útiles en la embarazada por carecer de efectos tóxicos para el feto.

d. CEFALOSPORINAS DE PRIMERA GENERACIÓN.

Cefalexina , cefradina , son activas contra enterobacilos sensibles, por el alto nivel de resistencia que han adquirido estos gérmenes , no se las incluyen en los planes empíricos de tratamiento . Son útiles cuando se conoce que el agente es sensible y en la embarazada porque no son toxicas para el feto, las de segunda generación **cefuroxime , y cefotaxime**, tienen una actividad antibacteriana similar frente a los microorganismos que con mayor frecuencia producen I.U . Para relacionar el uso de las cefalosporinas, evitar sobreinfecciones y desarrollo de resistencia, debieran utilizarse las de segunda generación para infecciones leves o moderadas y las de tercera generación para infecciones más graves y bacteriemias. **Ceftazidime**, debería reservarse para Pseudomonas y otros bacilos gramnegativos resistentes a los antibióticos ya mencionados.

e. TRIMETROPIM / SULFAMETOXAZOL (TMP /SMX).

Aunque por el alto nivel de cepas resistentes no esta indicado para un tratamiento empírico, es muy útil cuando se conoce que el germen sea sensible, pues los elimina del reservorio de origen (vaginal), con lo que se disminuye el riesgo de recaídas.

f. FOSFOMICIN – TROMETAMOL.

Alcanza buenas concentraciones urinarias y es bactericida contra las bacterias, Gram. positivas y Gram. negativas que con mayor frecuencia producen I.U.

g. NITROFURANTOINA.

Es antiséptico y alcanza buenas concentraciones urinarias, pero no a nivel de los reservorios.

No es aconsejada en el primer trimestre de embarazo.

3. JUSTIFICACIÓN.

La infección urinaria, es la infección mas prevalente en la práctica médica, siendo frecuente el pedido de urocultivos al presenciar un sedimento urinario patológico, con o sin síntomas en el paciente.

Por tanto es importante, que los cultivos sean bien interpretados y se eviten acomodaciones subjetivas en la lectura, interpretación y reporte de resultados que disminuyen la utilidad diagnostica.

Dada la importancia de este examen microbiológico y con el motivo de brindar mayor eficacia, en el desarrollo y aislamiento de microorganismos productores de infecciones del tracto urinario. Se hace necesario desarrollar un manual de consulta con normas técnicas establecidas actualmente para los procedimientos e interpretación de urocultivos. Esta documentación escrita de los procedimientos necesarios para realizar el procedimiento de este espécimen clínico, será el instrumento que servirá de guía en la ejecución funcional y efectiva por todo el personal de la unidad de laboratorio especialmente para el personal que no corresponde al área de bacteriología. Cuanto más se hayan cumplido más completos y valiosos será el informe final. Razones económicas y de estructura del laboratorio pueden obligar a soslayar alguna fase y entonces el diagnostico microbiológico será, con certeza incompleto.

Este instrumento tiene como finalidad que la elaboración de este manual para urocultivos sea un documento de consulta actualizada en el que se podrá encontrar toda la descripción de los procedimientos funcionales y capacidad interpretativa de la forma mas explicita posible para que el operador pueda

realizar el diagnóstico sin necesidad de una instrucción personal, cada vez que se presenten dudas al respecto.

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

- Proporcionar un manual de procedimientos técnicos e interpretativos de urocultivos a partir de un método experimental, para el Laboratorio Especialidades El Alto (CNS). Según normas establecidas por el Instituto Nacional de Laboratorio INLASA.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar los diferentes componentes del sedimento urinario como indicador de urocultivos positivos.
- Contribuir a un mejor diagnóstico de una infección urinaria mediante la correcta toma de muestra.
- Establecer medio de cultivo apropiado para el diagnóstico de infecciones urinarias.
- Realizar la calibración del asa bacteriológica, en base a métodos analíticos.
- Dotar de calidad en los procesos y resultados de laboratorio, en urocultivos.
- Redactar de modo sistemático, la elaboración del presente manual como guía de consulta

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1 METODOS

- **METODO EXPERIMENTAL.** Se efectuó un estudio experimental, como consecuencia del procesamiento y manipulación de una muestra biológica hasta la identificación del agente patógeno.

- **METODO COMPARATIVO.**

Comparación de métodos de siembra

- Asa Bacteriológica calibrada y Asa de Drigalsky como estándar
- Efectividad de los medios de cultivo (Agar Cled, Agar Nutritivo)

- **METODO DESCRIPTIVO.**

De todas las condiciones existentes en el procesamiento de urocultivos, registro, análisis e interpretación para la elaboración del resultado

5.2 EQUIPOS Y REACTIVOS

- Estufa bacteriológica.
- Refrigerador.
- Autoclave.
- Espectrofotómetro.
- Balanza Analítica.
- Mechero.

- **MATERIALES NO FUNGIBLES.**

- Asa bacteriológica calibrada.
- Cajas Petri.
- Micropipetas 10 ul.
- Tubos de ensayo.
- Porta objetos.

- **MEDIOS DE CULTIVO**

- Agar Cled.
- Agar Nutritivo.
- Agar Sangre

- Medios Referenciales. (TSI, LIA, SIM, MIO, CTRATO, UREA).

• **REACTIVOS**

- Solución fisiológica.

- Agua oxigenada.

- Reactivo de Kovacs

5.3 PROCEDIMIENTO PREVIO AL CULTIVO.

Se seleccionaron consecutivamente 50 sedimentos urinarios, con sus respectivos urocultivos obtenidos con técnica del chorro medio de pacientes ambulatorios remitidos a la sección de bacteriología del laboratorio Policlínico Especialidades El Alto (CNS).

5.3.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.

ORINA DE CHORRO MEDIO.

MUJERES:

- Asear el meato urinario con gasas estériles, empapadas en jabón y abundante agua (región genital).
- Repetir el procedimiento por lo menos 3 – 4 veces. El lavado realizarlo de la forma más cuidadosa posible.
- Realizar el enjuague con gasas húmedas en el mismo movimiento, importante, no usar las gasas más de una vez.
- La micción se efectúa manteniendo los labios separados de manera que el chorro de orina no toque los genitales externos, en un frasco estéril de boca ancha (provisto por el laboratorio), teniendo cuidado que sea el chorro medio (desechar la primera y la última parte de la orina).

HOMBRES:

- Se retira el prepucio, y se lava el glande con una esponja en solución jabonosa no bactericida durante 3 – 4 veces consecutivas.
- Secar con una gasa estéril, y se recoge la parte intermedia de la micción en un recipiente estéril.

NIÑOS:

- Lavar la región genital con una esponja empapada en detergente no bactericida repitiendo la acción 3 veces consecutivas y secándolo con una gasa estéril.
- A continuación se le sostiene boca abajo frotándole los músculos para espinales, lo cual estimula sus deseos de orinar, recogiendo en un recipiente estéril cuanto orina sea posible.

LACTANTES (bolsa colectora)

- Realizar higiene de genitales externos.
- Colocar la bolsa colectora esterilizada. Dejar hasta que se produzca la acción, tiempo que no será mayor a 30 minutos de no haber producido la micción y transcurrido el tiempo mencionado se deberá retirar la bolsa colectora y cambiar por una nueva bolsa estéril con el aseo previo respectivo. Algunas veces la demora puede ser de 45 minutos pero nunca llega a la hora.
- Identificar la bolsa con el nombre, fecha y hora de la toma de muestra.
- Trasladar inmediatamente a laboratorio.

2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:

Las muestras de orina deben ser enviadas a laboratorio en forma inmediata ya que la permanencia a la T. ambiente, permite la multiplicación bacteriana lo que

altera en forma significativa el recuento de colonias.

La muestra de orina debe ser sembrada, antes de una hora después de tomada la muestra. Si no puede enviarse de inmediato al laboratorio debe mantenerse en refrigerador a 4° C no mayor a cuatro horas.

En caso de tratarse de un paciente interno, si el traslado al laboratorio demora más de 15 minutos, deberá transportarse dentro de un contenedor con hielo, ya que por ser la orina un excelente espécimen para cultivo, las bacterias podrían proliferar rápidamente, falseando los resultados.

5.3.3 RECEPCION Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Consiste en determinar, si la muestra cumple o no los requisitos de calidad necesarios para ser procesada. Estos incluyen:

- La correcta identificación de la muestra.
- La valoración sobre si existe una cantidad adecuada para el examen solicitado
- y la comprobación de las condiciones adecuadas de transporte y conservación.

Cada laboratorio de bacteriología debe disponer de unas normas de recepción y aceptación de muestras para el diagnóstico microbiológico

El laboratorio somete a la muestra a un procesamiento en función de sus protocolos de trabajo que se halla plasmado en este manual y de la información que aporta al servicio solicitante sobre la muestra y el paciente.

5.3.4 VARIABLES ANALIZADAS DEL SEDIMENTO URINARIO.

- Leucocitos urinarios.
- Cilindros leucocitarios.
- Presencia de gérmenes bacterianos.
- Detección de células epiteliales.

5.3.5 CULTIVO URINARIO DEACUERDO A LA OBSERVACION PREVIA DEL SEDIMENTO.

Se realizo con el siguiente criterio:

- Sedimento normal y ausencia de gérmenes: placas de Agar Cled o Agar Nutritivo.
- Sedimento patológico y ausencia de gérmenes: placas de Agar Cled, Agar Mac Conkey, Agar Sangre.
- Presencia de bacilos independientemente del sedimento: placas de Agar Cled, o agar nutritivo, Agar Mac Conkey.
- Presencia de cocos, independientemente del sedimento: Placas de Agar Cled, Agar Sangre.

6. DETERMINACION DEL CALIBRE DEL ASA BACTERIOLOGICA.

.Para la determinación del calibre del asa se realizó los siguientes procedimientos:

6.1 MÉTODO COLORIMETRICO

- Se agrega una asada de azul de metileno, hecha un muestreo con el asa cuyo calibre se determina con la lectura del muestreo.
- De un envase de 60 ml de colorante en una caja petri que contiene 10 ml de agua destilada.
- Posteriormente alicuotar 2 ml de esta solución en una cubeta.
- Se procede a realizar la lectura de absorbancia a 590 nm en el espectrofotómetro
- Con un patrón de medida, en este caso (para el asa ,0.01ml) comparar la absorbancia para el muestreo una micropipeta de 10 ul con igual procedimiento. Anotar el dato y realizar cálculos.

Volumen del estándar 0.01ml

Absorbancia de la Muestra 0.134

Absorbancia del asa 0,121

$$\frac{\text{Abs Asa}}{\text{Abs estándar} \times \text{Vol. estándar}}$$

$$V = 0,0090 \text{ ml}$$

DETERMINACION DEL FACTOR DE CORRECCION.

$$\text{FACTOR DE RCTO} = \frac{1\text{ml}}{\text{Vol del asa}}$$

$$\text{FACTOR RCTO} = 111.7$$

6.2 MÉTODO GAVIMÉTRICO.

- Se observa el cambio de peso cuando se aporta una asada de agua a un disco de papel filtro colocado en una balanza analítica altamente sensible
- Considerando que la densidad del agua es igual a 1, la diferencia de peso determinado será equivalente al volumen recogido por el asa bacteriológica

Peso de l papel filtro seco 0,6064 gr.

Peso del papel filtro + agua 0,6153 gr.

Peso del Agua: 0,6153 g - 0,6064 gr

Peso del Agua: 0,0089 gr.

$$V = \frac{\text{Peso (gr)}}{\text{Densidad (gr / ml)}}$$

$$V = 0,0089 \text{ ml}$$

7. METODOS DE SIEMBRA.

7.1 METODO DEL ASA CALIBRADA.

- Quemar el asa calibrada 0,01 ml basándola por la llama, dejar que enfrié apoyándola en posición invertida sin que toque ninguna superficie o introduciendo a la muestra.
- Mezclar la orina cuidadosamente mediante movimientos circulares (20 veces consecutivas), y destapar el recipiente, insertar el asa verticalmente en la muestra para que la orina se adhiera al arco.
- Se inocula a l medio depositando la cantidad de muestra tomada con el asa calibrada en la superficie del medio de cultivo contenido en la caja Petri en el centro del Agar y a partir de ahí se traza una línea recta de extremo a extremo de la caja.
- Con la misma asa, y sin tomar más muestra ni esterilizarla, se realiza una estriación en zig - zag de manera que intercepte la línea central de lado a lado en toda la superficie del agar.

7.2 MÉTODO ESTANDAR ASA DE DRIGALSKY.

- Con la ayuda de una micropipeta de 10ul, se coloca la muestra en el medio de cultivo.
- Luego con un asa de Drigalsky se dispersa la muestra sobre toda la superficie del agar rotando la caja Petri por dos o tres veces para asegurar una distribución uniforme.

Para disminuir la probabilidad de sesgos en manipulación e interpretación del recuento en cada sesión de trabajo se realizo un método diferente a partir de alícuotas provenientes de una misma muestra, tomando en cuenta los parámetros

de desarrollo bacteriano (ufc / ml), para determinar si se continua con el estudio microbiológico de la muestra sembrada por cualquiera de los dos métodos:

Estos métodos fueron repetidos por 15 días consecutivos. Se tomaron 2 muestras por día, el total de muestras analizadas fueron de 30 pacientes.

8. CULTIVO.

8.1 CULTIVO CUANTITATIVO.

El concepto se refiere a la cantidad de bacterias que hay que encontrar en una orina para considerar que esta infectada.

8.2 EVALUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

En el presente trabajo se procesaron 50 muestras de orina, cada muestra se sembró con la técnica de asa bacteriológica en ambos medios **AGAR NUTRITIVO** Y **AGAR CLED** (Agar con cisteína y lactosa deficientes en electrolitos).

Con el fin de hacer una comparación del desarrollo bacteriano y aislamiento primario según las exigencias nutricionales de algunos microorganismos.

8.3 INCUBACION.

8.3.1 ATMOSFERA.

Dada que la mayoría de los patógenos urinarios son facultativos. Las condiciones de incubación favorables para su desarrollo y multiplicación son las siguientes:

- Placas de Agar Sangre en atmósfera enriquecida con CO₂ y 5%, en anaerobiosis (lata con vela).
- Placas de Agar Cled, Agar Nutritivo, Agar Mac Conkey se incuban en atmósfera ambiental aerobiosis.

8.3.2 TEMPERATURA

La incubación debe realizarse a 35 ± 2 ° C.

8.3.3 TIEMPO.

El tiempo de incubación se realizo de 24 – 48 hrs., antes de asumir la muestra como negativa.

8.4 INTERPRETACION DEL RECUENTO BACTERIANO.

La interpretación del desarrollo de microorganismos en un Urocultivo en la bacteriología medica cuantitativa se realiza según los criterios de Kass ; que consiste en realizar el recuento de colonias , el número de colonias presentes en la caja se debe multiplicar por el factor hallado en la determinación del calibre de asa según el siguiente esquema:

- Si el recuento de colonias es menor a 10.000 ufc /ml, no se realiza antibiograma.
- Si el recuento de colonias va de 10.000 a 100.000 ufc/ml, se realiza identificación bacteriana y antibiograma, siempre y cuando el cultivo sea puro, pero si es polimicrobiano, solicitar nueva muestra porque la muestra está contaminada.
- Si el recuento de colonias es mayor a 100.000 ufc /ml realizar identificación bacteriana y antibiograma.

8.5 IDENTIFICACION DEL AGENTE ETIOLOGICO.

Mediante la utilización de la tinción de **GRAM** se visualiza y precisa la morfología de las bacterias aisladas mediante el cultivo, para decidir las pruebas a realizar para la identificación definitiva.

Una vez aislado el agente causante, por motivos asistenciales, epidemiológicos y científicas obvios se procede a su identificación mediante una

serie de pruebas bioquímicas o de otra índole preestablecidas.

- .Si se observan **BACILOS GRAM NEGATIVOS**, se aislara el germen en medios selectivos y se debe realizar la siembra de las colonias en el set de pruebas bioquímicas para el diagnostico del genero.

- La identificación del microorganismo se realiza mediante comparación de cartillas patrones que indican *las características de cada bacteria*.

- *En caso de ser **COCOS GRAM POSITIVOS***, se procede a realizar las pruebas bioquímicas para la identificación de la especie.

Todas las pruebas de identificación se encuentran en detalle en este manual.

9. RESULTADOS.

a. SEDIMENTO URINARIO.

TABLA N o 1 UTILIDAD DEL SEDIOMENTO URINARIO COMO INDICADOR DE UROCULTIVOS POSITIVOS.

SEDIMENTO URINARIO	UROCULTIVO	INDICADOR
. Leucocitos Urinarios	+ / -	. Probable bacteriuria significativa (B.S), o Proceso inflamatorio.
. Cilindros Leucocitarios	+ / -	. Asociada a I.T.U
. Gérmenes Bacterianos	+	. Infección del tracto Urinario.
. Células epiteliales	No procede	. Contaminación de la muestra (mala recolección).

En la tabla N ° 1, Se muestra que el hallazgo de gérmenes en examen directo del Sedimento urinario es un indicador de urocultivos positivos.

- La presencia de cilindros y leucocitos urinarios no se asocian a urocultivos positivos de manera significativa.

- La detección de células Epiteliales (CE); su presencia indica muy probablemente contaminación de la muestra, debe solicitarse nueva muestra para confirmar

.b. SIEMBRA MICROBIOLÓGICA.

TABLA N ° 2 RECUENTO DE COLONIAS DE LOS DIFERENTES METODOS DE SIEMBRA.

MÉTODO DE SIEMBRA		
<i>DIAS</i>	<i>ASA CALIBRADA N de colonias</i>	<i>ASA DRIGALSKY N de colonias</i>
<i>1</i>	<i>105</i>	<i>102</i>
<i>2</i>	<i>100</i>	<i>104</i>
<i>3</i>	<i>103</i>	<i>100</i>
<i>4</i>	<i>100</i>	<i>101</i>
<i>5</i>	<i>100</i>	<i>99</i>
<i>6</i>	<i>106</i>	<i>104</i>
<i>7</i>	<i>103</i>	<i>100</i>
<i>8</i>	<i>105</i>	<i>103</i>
<i>9</i>	<i>104</i>	<i>102</i>
<i>10</i>	<i>103</i>	<i>102</i>
<i>11</i>	<i>100</i>	<i>104</i>
<i>12</i>	<i>101</i>	<i>102</i>
<i>13</i>	<i>104</i>	<i>103</i>
<i>14</i>	<i>103</i>	<i>105</i>
<i>15</i>	<i>102</i>	<i>100</i>

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

X ufc/ml asa bact = 102.6

X ufc/ml asa Drig = 102.1

FACTOR DE CORRECCION

$$F_c = \frac{V. \text{ te\u00f3rico}}{V. \text{ pr\u00e1ctico}}$$

- Asa bacteriol\u00f3gica Fc. = 0.975
- Asa Drigalsky Fc. = 0,98

Al realizar la evaluaci\u00f3n de ambos m\u00e9todos:

M\u00e9todo de asa calibrada y M\u00e9todo de dispersi\u00f3n de asa de Drigalsky por los 15 d\u00edas consecutivos se demuestra que ambas t\u00e9cnicas evaluadas son validas, pero por los resultados obtenidos se observa que el m\u00e9todo de dispersi\u00f3n con asa de Drigalsky tiene un menor margen de error.

c. EVALUACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

TABALA N \u00b0 3 Comparaci\u00f3n del desarrollo de colonias en Agar Cled y Agar Nutritivo

DIFERENCIA ENTRE NÚMERO DE COLONIAS	AGAR NUTRITIVO		AGAR CLED	
	N DE MUESTRAS	%	N DE MUESTRAS	%
MAYOR NÚMERO	9	30	12	40
MENOR NÚMERO	11	37	8	27
IGUAL NÚMERO.	10	33	10	33
TOTAL.	30	100	30	100

Se evidencia, por la comparación de recuentos de colonias por ml obtenidas en Agar Nutritivo frente al Agar Cled, que este último permite el crecimiento de la mayoría de patógenos urinarios presentándose un recuento de colonias por ml superior en un 40 %, por lo que se recomienda sea el medio de elección en un cultivo cuantitativo.

Tabla N °4 CRITERIO DE INFORME SEGÚN INTERPRETACIÓN DEL DESARROLLO BACTERIANO ufc/ml.

RECuento (ufc/ml)	INTERPRETACIÓN	INFORME
≥ 100.000	Bacteriuria significativa	.Identificación bacteriana y antibiograma
10.000 – 100.000	.Monomicrobiana bacteriuria significativa. Polimicrobiana probable bacteriuria significativa.	Identificación del germen Más antibiograma. .Solicitar nueva muestra
1000 o < 10.000	Bacteriuria no significativa	Ausencia de desarrollo bacteriano ATB no procede

En dicha tabla la mención de bacteriuria significativa (B.S), sugiere que el informe debería incluir el Recuento, el nombre de la especie, y el antibiograma. El hecho de informar al médico estos tres elementos, expresa claramente que para el microbiólogo desde el punto de vista de laboratorio, el hallazgo es significativo.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La correcta recogida y conservación de la orina para urocultivos es fundamental para que puedan obtenerse resultados fiables ya que la posibilidad de contaminación es muy alta y puede incluir a la generación de resultados falsamente positivos.

La calidad del diagnóstico bacteriológico efectuado en el laboratorio depende directamente de la calidad de la muestra enviada.

- El hallazgo más importante, en la observación previa del sedimento urinario como indicador de urocultivos positivos es la presencia de gérmenes bacterianos; además el sedimento urinario ofrece la ventaja de cultivar el microorganismo en el medio más apropiado, tanto para su desarrollo como para su caracterización macroscópica; (aspecto de la colonia, fermentación de la lactosa, tipo de hemólisis, etc.) . Por lo que posibilita orientar con mayor certeza el esquema inicial de identificación, como se indica en el presente trabajo.

- Se realizó la determinación del calibre del asa bacteriológica tanto por el método colorimétrico como el nanométrico y la determinación del factor de recuento. Por los resultados obtenidos se ve claramente que ambas técnicas son recomendables; pues la evaluación del asa calibrada frente al asa de Drigalsky como método estándar garantiza que dicha técnica es válida como siembra de rutina en el laboratorio clínico.

Se debe saber que la técnica de siembra bacteriológica en los urocultivos es uno de los parámetros más importantes para la identificación e interpretación del recuento bacteriano, pues la técnica de siembra empleada en el cultivo determina, la dispersión y distribución de las colonias de las bacterias sobre el Agar facilita o dificulta la interpretación inicial de proseguir o no con el análisis microbiológico.

- El medio de cultivo más apropiado en el análisis cuantitativo es el Agar Cled, lo cual se comprobó en el presente trabajo, con el que se obtuvo un mayor crecimiento, sus características y condiciones nutricionales favorece al desarrollo de la mayoría de los patógenos especialmente de aquellos nutricionalmente exigentes con el que se logra un mejor aislamiento de colonias bacterianas, como medio de cultivo primario nos ayuda a lograr un diagnóstico más certero y una diferenciación más temprana del agente etiológico.

- Es importante el análisis bacteriológico confiable y oportuno para el establecimiento de un buen diagnóstico microbiológico de una de las infecciones más frecuentes que es la infección urinaria, ningún laboratorio puede prescindir de un instrumento que refleje y corrobore la seriedad del trabajo y sus resultados. Es por eso que se considero importante el proporcionar a la Unidad de Laboratorio del Policlínico Especialidades El Alto (CNS), un instrumento de consulta para el procesamiento de urocultivos, procedimiento de laboratorio que se realiza con más frecuencia.

11. BIBLIOGRAFIA.

- . Recomendaciones para el diagnostico microbiológico de la infección urinaria. Rev.chil. infectol. vl . 18 n. 1 Santiago 2002.
- . MESA J. Infecciones de las vías urinarias. En Farreras – Rozman. Medicina Interna. (vol 1). Barcelona: Ediciones Doyma , 1992; pag .909-913.
- . LEAÑOS MIRANDA A, Contreras I, Camacho R, Villagomez E. Rendimiento diagnostico de algunas pruebas en orina en las infecciones de vías urinarias. Rev Invest Clin 1996; 48: 117-123.
- . KONEMAN W.y colab. Diagnostico Microbiológico: Texto Atlas Color Trad por Nora Meeroff y col. 3 ed Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana 1992,124-152.
- . JAWETZ Ernest. Et-al. Microbiología médica 15 ° ed. Mexico D. f. Ed El Manual Moderno S.A 1996; 138.
- . GOMEZGE .Infección de las vías urinarias III.Lab Med 1996; 4: 11-21.
- . TRIGOSO Cristián y Colaboradores Bacteriología básica. La Paz - Bolivia Tomo 1. 1ra Edición. 1992.12:167-169.

- . TRIGOSO, Damián, Albarracin, Garcia - Manual de Laboratorio de Bacteriología Clínica. Editorial EDEBOL. 1ra edición .2002. La Paz –Bolivia.
- . SCOTT Bayley. Diagnostico Microbiológico. 7ma edición. Editorial Panamericana, 2000; 273-277.
- . Instituto de Salud Pública de Chile, Procedimientos Técnicos de Laboratorio Clínico, Vol IV Santiago de Chile.
- . PAYAN Andrey , MSc., Claudia Patricia Valencia , MSc. Validez de los Métodos de cultivo y recuento bacteriano empleados en el diagnosticote infecciones urinarias.
- . CIRESN Miriam, Hélice Freijoso .Guía para la practica clínica en infecciones del tracto urinario. Rev Cubana Med Gen Integr 2002; 18:2.
- . NINA G Beatriz. Infecciones de vías urinarias en edad pedriatica, Archivos Bolivianos de Medicina, Vol VI, N ° 63, Sucre – Bolivia; 1999; 10.
- . LOPARDO H. El diagnostico microbiológico de la infección urinaria.En: Argeri N, H. Lopardo (Ed). Análisis de orina. Fundamentos y práctica. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires 1993; pag .163-178.
- . ERGUETA COLLAO Jorge. Técnicas de Laboratorio clínico .Librería editorial juvenil. 3ra Edición La paz – Bolivia 1986.

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA BIOQUIMICA

***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
PARA LA REALIZACION DE
UROCULTIVOS***

LA PAZ - BOLIVIA

2005

PRESENTACIÓN

Ningún laboratorio puede prescindir de un instrumento que refleje y corrobore la seriedad del trabajo y sus resultados; es por ello que el presente trabajo intenta unificar todo el criterio técnico de procesamiento e interpretación de éste examen en el laboratorio de microbiología, logrando el objetivo planteado. es decir, claridad, objetividad y orden en las distintas fases que compone un examen de Urocultivo de I.T.U.

En este manual, el lector encuentra reunida bases bioquímicas, medios y reactivos empleados, su preparación además toda la información que se refiere al procesamiento, conservación de la muestra, seleccionando las pruebas bioquímicas que se realizan con mayor frecuencia, su principio, fundamento Y un control de calidad de las respectivas pruebas y su interpretación.

Con seguridad que el buen uso de este manual redundará en una mejor atención a los pacientes y naturalmente condicionará un seguro progreso y beneficio en el ejercicio de nuestra profesión.

II. AGENTES ETIOLÓGICOS A INVESTIGAR RUTINARIAMENTE:

- Escherichia coli:
- Staphylococcus Spp.
- Enterococo.
- Proteus Spp.
- Klebsiella pneumoniae.
- Acinetobacter Spp.
- Enterobacter.
- Cándida.
- Streptococo grupo "B" (imprescindible en embarazadas)
- Pseudomonas Spp.

A. CONTAMINANTES FRECUENTES EN ORINA NORMAL:

- Staphylococcus coagulosa negativa.
- Dipteromorfos.
- Coliformes.
- Bacillus.
- Streptococcus Alfa hemolítico

B. RECOLECCIÓN DE TOMA DE MUESTRA PARA UROCULTIVOS

CHORRO MEDIO

1. MUJERES:

- Asear el meato urinario con gasas estériles, empapadas en jabón y abundante agua (región genital).
- Repetir el procedimiento por lo menos 3 – 4 veces. El lavado realizarlo de la

forma más cuidadosa posible.

- Realizar el enjuague con gasas húmedas en el mismo movimiento, importante, no usar las gasas más de una vez.
- La micción se efectúa manteniendo los labios separados de manera que el chorro de orina no toque los genitales externos, en un frasco estéril de boca ancha (provisto por el laboratorio), teniendo cuidado que sea el chorro medio (desechar la primera y la última parte de la orina).

2. HOMBRES:

- Se retira el prepucio, y se lava el glande con una esponja en solución jabonosa no bactericida durante 3 – 4 veces consecutivas.
- Secar con una gasa estéril, y se recoge la parte intermedia de la micción en un recipiente estéril.

3. NIÑOS:

- Lavar la región genital con una esponja empapada en detergente no bactericida, repitiendo la acción 3 veces consecutivas y secándolo con una gasa estéril.
- A continuación se le sostiene boca abajo frotándole los músculos para espinales, lo cual estimula sus deseos de orinar, recogiendo en un recipiente estéril cuanto orina sea posible.

4. LACTANTES (bolsa colector)

- Realizar higiene de genitales externos.
- Colocar la bolsa colector esterilizada. Dejar hasta que se produzca la acción, tiempo que no será mayor a 30 minutos de no haber producido la micción y transcurrido el tiempo mencionado se deberá retirar la bolsa colector y cambiar por una nueva bolsa estéril con el aseo previo respectivo. Algunas veces la demora puede ser de 45 minutos pero nunca llega a la hora.
- Identificar la bolsa con el nombre, fecha y hora de la toma de muestra.
- Trasladar inmediatamente a laboratorio.

C. RECEPCIÓN DE LA MUESTRA:

Todas las muestras deben rotularse en forma adecuada y acompañarse de una orden de examen en la que debe incluir:

- Nombre y apellido.
- Edad y sexo.
- Procedencia (Ambulatorio – Internado)
- Número de historia clínica y de cama (si está internado)
- Tipo de muestra remitida.
- Modo de toma de muestra.
- Fecha y hora de la toma.
- Diagnóstico clínico.
- Si hay antibiótico previo.
- Tratamientos concomitantes: Corticoides, Inmunosopresores, etc.
- Servicio solicitante.

- Nombre del médico solicitante.

Las muestras con valor informativo deben obtenerse antes de la administración de antibióticos. Si el enfermo ya estuviera en tratamiento antibiótico, este debe suspenderse durante 24 – 48 horas y posteriormente tomar la muestra.

D. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:

Las muestras de orina deben ser enviadas a laboratorio en forma inmediata ya que la permanencia a la temperatura ambiente, permite la multiplicación bacteriana, lo que altera en forma significativa el recuento de colonias.

La muestra de orina debe ser sembrada, antes de una hora después de tomada la

muestra. Si no puede enviarse de inmediato al laboratorio debe mantenerse en refrigerador a 4° C, no mayor a 4 horas.

En caso de tratarse de un paciente interno, si el traslado al laboratorio demora más de 15 minutos, deberá transportarse dentro de un contenedor con hielo, ya que por ser la orina un excelente espécimen para cultivo, las bacterias podrían proliferar rápidamente, falseando los resultados.

III. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA PREVIO AL CULTIVO.

A. ASPECTO DE LA MUESTRA:

Debe tomarse en cuenta los siguientes parámetros:

- **Aspecto Límpido:** Generalmente transparente
- **Aspecto ligeramente Opalescente:** Existe regular cantidad de sedimento Urinario.
- **Aspecto Opalescente:** Abundante cantidad de sedimento urinario
- **Aspecto turbio:** Debido a la ingesta de alimentos (por Ej., grandes cantidades

de grasa) o la presencia de uratos o fosfatos

B. Determinación P^H urinario semicuantitativo:

Para hacer uso de este medio diagnóstico se requiere que la orina sea estéril.

El P^H urinario normalmente es alrededor de 6.0 y varía dependiendo del estado ácido – base, su mayor uso clínico ocurre en pacientes con acidosis metabólica donde el P^H de la orina puede disminuir a niveles bajos 5.0. En este caso, si la orina está alcalina significa que hay un proceso de acidificación renal como en el caso de acidosis tubular aguda.

C. EXAMEN MICROSCOPICO (Recomendado)

El procedimiento elegido debe permitir:

1. RECUENTO DE LEUCOCITOS Al menos semicuantitativo:

Generalmente se ven neutrofilos en infecciones, donde el urocultivo generalmente es positivo. Puede ser negativo para T.B.C.

2. DETECCIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES (C.E)

Su presencia indica muy probablemente contaminación de la muestra por contacto con genitales externos.

Ante un resultado (urocultivo) positivo si se observa presencia de células Epiteliales, debe pedirse nueva muestra para confirmar.

3. PRESENCIA DE GERMENES BACTERIANOS

Son indicadores de infección del tracto urinario (I.T.U.).

4. REPORTE

de células contados / ml.

IV. CULTIVO.

A. CULTIVO CUANTITATIVO.

1. MEDIOS DE CULTIVO A UTILIZAR: Agar Cled, Agar Mac Conkey, Agar Sangre (Casos especiales).

1.1 SEMBRADO DE LA MUESTRA:

ASA CALIBRADA:

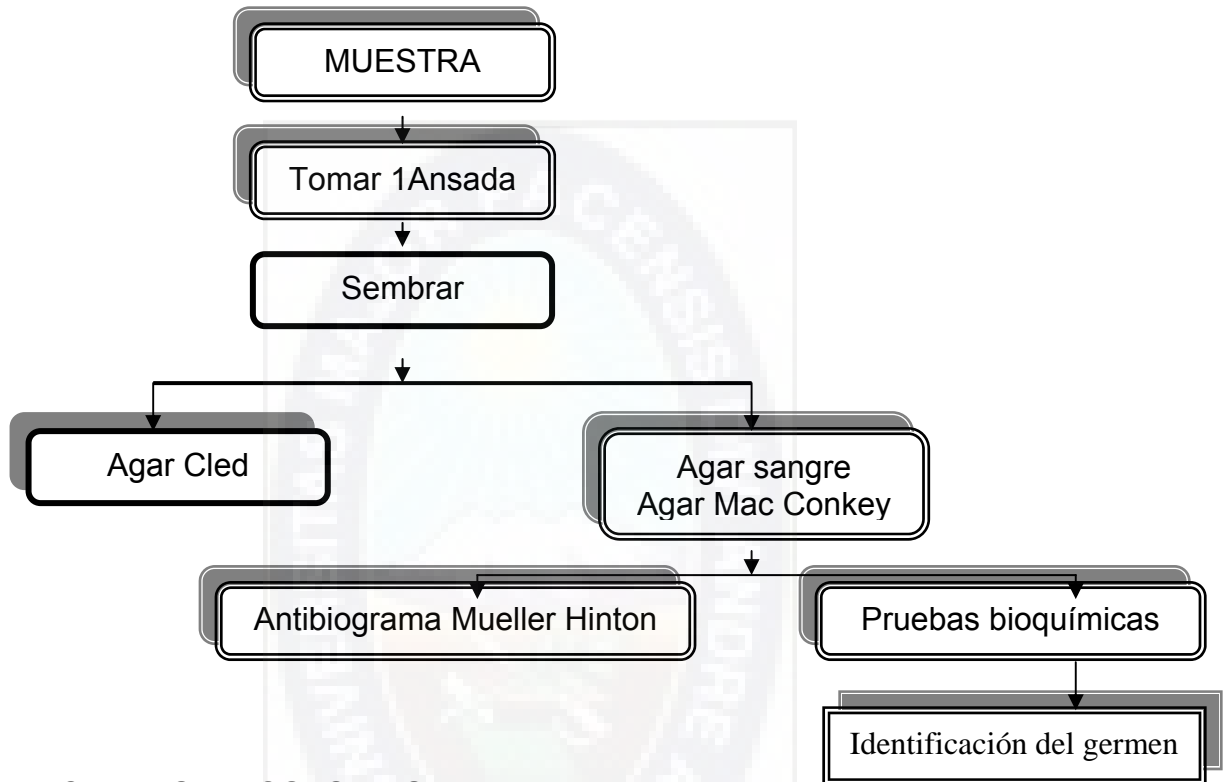
- a). Mezclar bien la muestra con movimientos de rotación (20 veces)
- b). Abrir el frasco de orina al lado de un mechero para evitar su contaminación.
- c.) Quemar la asa de platino con el borde del mechero y enfriar en el borde de la placa petri.
- d). Tomar 5 ansadas sobre un extremo del agar CLED, sembrar por agotamiento en toda la superficie de la placa.
- e.) sembrar 2 – 3 ansadas, en Agar Mac Conkey estriando la muestra.

2. INCUBACIÓN:

- Una vez realizada la siembra microbiológica se somete a una incubación por 24 hrs. a 35 - 37° C en aerobiosis.
- De acuerdo con los resultados obtenidos se determina, si son aptas para proseguir con el estudio microbiológico o no.
- Si se confirma el diagnóstico de infección urinaria tomando en cuenta los parámetros para la interpretación del urocultivo ; entonces se procede a la identificación del agente etiológico.
- Si por el contrario no existe desarrollo bacteriano, se incuba 24 hrs. Más a 35 – 37° C en aerobiosis antes de reportar como negativo.

Gráfico No. 1.

RESUMEN DE UROCULTIVO



3. RECUENTO DE COLONIAS:

- Para el recuento de colonias se traza por la parte externa de la contratapa de la caja petri dos líneas perpendiculares dividiendo la caja en cuatro cuadrantes.
- Se cuenta las colonias de uno de los cuadrantes, la cifra obtenida es multiplicada por cuatro y el resultado de éste es multiplicado por el factor obtenido en la determinación del calibre del asa bacteriológica más el número de ansadas de muestra sembrada, es decir:

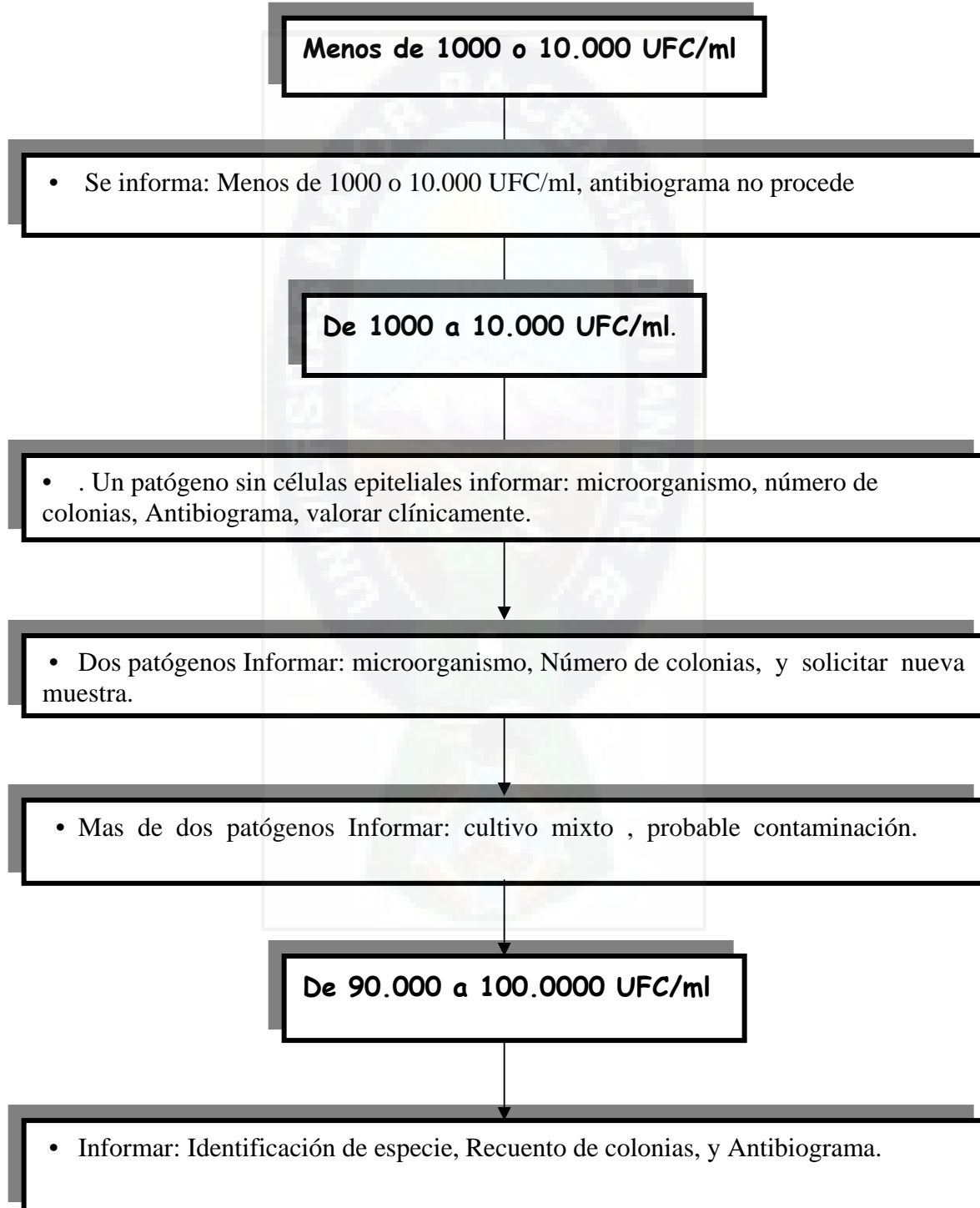
$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias} / 5 \times 1\text{ml}}{0.01 \text{ ml}}$$

De esta manera se obtiene el número de colonias por ml.

4. INTERPRETACION.

CUADRO N.º1 INTERPRETACIÓN DEL SEGUIMIENTO BACTERIOLÓGICO

SEGÚN RECuento DE COLONIAS:



B. CULTIVO CUALITATIVO.

1. IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE PATÓGENO:

Se debe tomar en cuenta la diferenciación de colonias macroscópicamente y microscópicamente.

1.1 DIFERENCIACION MACROSCOPICA.

De acuerdo a la apariencia de cada colonia, se determina el número de colonias presentes en el cultivo.

Se debe tomar en cuenta las características: como ser:

- Borde.
- Superficie.
- Aspecto.
- Consistencia
- Tamaño.
- Color.
- Presencia o no de hemólisis (casos especiales)

2. DIFERENCIACION MICROSCOPICA.

2.1. TINCION DE GRAM

La tinción de GRAM, es uno de los métodos más importantes en el laboratorio bacteriológico y con el que el operador debe estar perfectamente familiarizado.

Su utilidad práctica es indiscutible. En el trabajo de rutina del laboratorio de microbiología, se visualiza y precisa la **Morfología Celular Bacteriana** (cocos, bacilos, positivos, negativos, etc.)

2.2. INTERPRETACIÓN.

Las bacterias GRAM – positivas, aparecen de color violeta.

Las bacterias GRAM – negativas, aparecen de color rosados claros.

A partir de ésta identificación se realiza pruebas de identificación definitiva.

V. PRUEBAS DE IDENTIFICACION

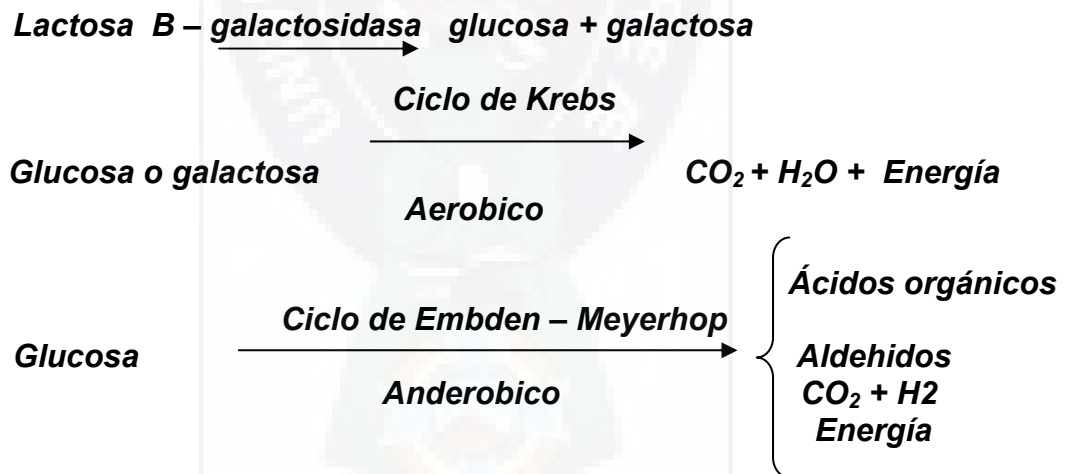
A. BACILOS GRAM (-)

Se aislara el germen de medios selectivos una sola colonia y se sembrará en un set de pruebas bioquímicas para el diagnóstico del germen.

1. PRUEBA BIOQUÍMICA DEL TSI.

Material	Equipo	Reactivo
Tubos de tapa de rosca de 13 x 100 mm.	Estufa a 35° C	Medio de cultivo deshidratado.

Fundamento:



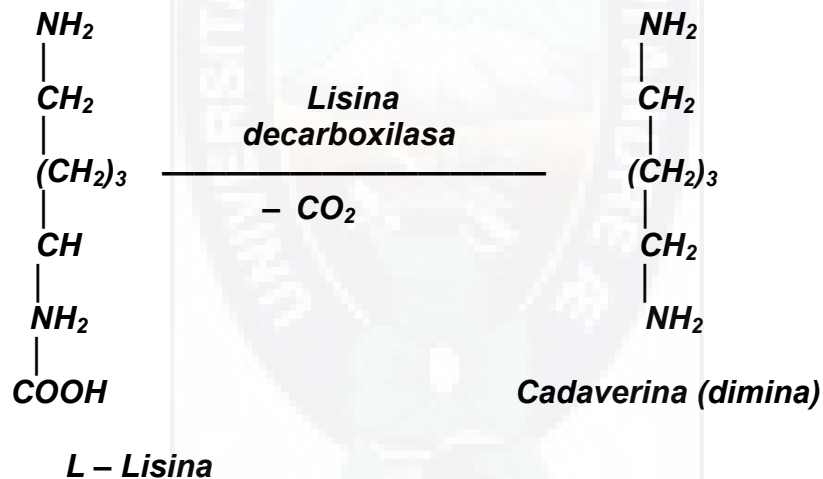
PROCEDIMIENTO

- A partir de un colonia aislada.
- Sembrar con aguja bacteriológica por picada en la columna en la zona de pico de flauta.
- Incubar a 35° C por 18 – 24 horas.

1.1. PRUEBA – AGAR - LISINA - HIERRO. (LIA)

Material	Equipos	Reactivos
Tubos de tapa de rosca de 13 x 100 mm.	Estufa a 35° C Mechero	Medio de Cultivo deshidratado.

Fundamento:



El aminoácido L – Lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina (diamina) y anhídrido carbónico por acción de la enzima Lisina – Descarboxilasa.

Procedimiento:

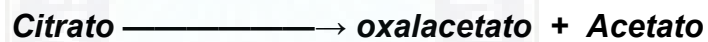
- Tubo con agar inclinado (3 ml). Elegir una colonia bien aislada se toma con aguja bacteriológica un toque de la colonia.
- Realizar punción en la columna; al retirar la aguja de la columna, se realiza la incubación por estría y agotamiento en la zona inclinada.

- Se incuba a 35° C por 24 horas.

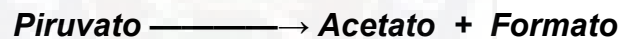
1.2. PRUEBA – CITRATO

Material	Equipos	Reactivos
Tubos de tapa de rosca de 13 x 100 mm.	Estufa a 35° C Mechero	Agar Citrato Deshidratado

Fundamento:



P^H Alcalino



P^H Ácido



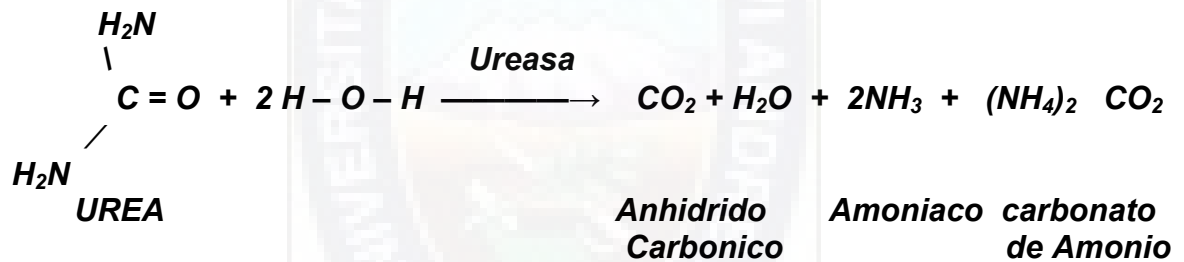
Procedimiento:

- En un tubo con 2 ml. De Agar, elegir una colonia bien aislada de la que se toma con aguja bacteriológica un toque de la misma evitando arrastras medio de cultivo (provoca falsos positivos).
- Inocular el medio con una sola estría a lo largo de la superficie inclinada.
- Incubar a 35° C por 24 a 48 horas.

1.3. PRUEBA – UREASA

Material	Equipos	Reactivos
Tubos de tapa de rosca de 13 x 100 mm.	Estufa a 35° C Mechero	Agar Urea Deshidratado Caldo Urea

Fundamento:



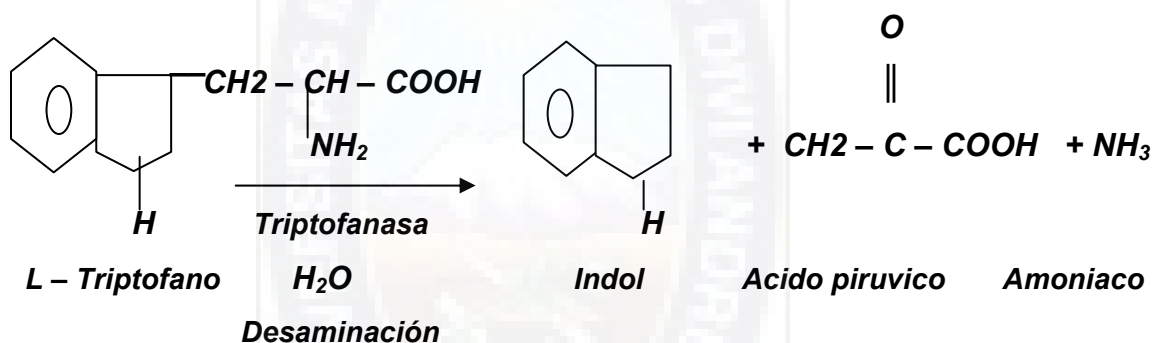
Procedimiento:

- Tubo con 2ml de caldo o con 3ml de Agar inclinado.
- En el Agar , elegir una colonia bien aislada .Se toma con aguja bacteriológica un toque de colonia.
- Inocular el medio por estría a lo largo de la superficie inclinada.
- En el caldo se toma un asa de la colonia.

1.4. PRUEBA – BIOQUÍMICA DEL INDOL

Material	Equipos	Reactivos
Tubos de tapa de rosca de 13 x 100 mm.	Estufa a 35° C Mechero	Base de pepsina Reactivo de Kovacs o Ehrlich

Fundamento:



- Inocular por picada el microorganismo en agar movilidad, caldo peptinado o SIM.
- Incubar a 35° C durante 18 a 24 horas.

Lectura:

Añadir dos a tres gotas de reactivo de Kovacs o de Ehrlich y observar la presencia o ausencia de color.

BACILOS GRAM NEGATIVOS

Especies	TSI				KIA	LIA	INDOL	R. M.	CITR	MOT	UREA	ORN	OXID
	Colum./	Estría/	Gas/	H2S									
E. Coli	A	A	+	-	NR	+	+	+	-	+	-	+	-
Enterobacter spp	A	A	+	-	NR	-	-	+	+	V	+	-	
Klepsiell spp	A	A	+/-	-	NR	+	-	-	+	-	+	-	-
Citrobacter spp	A	A	+	v	NR	-	-	+	+	V	V	-	
Proteus spp	A	IN/AL	+	++	NR	+	+	-					
Pseudomonas aeruginosa	IN	IN			NR	-	-	+	-	+	-	-	+

OXID: Oxidasa/ CITR: Citrato / R. M.: Rojo de Metilo / MOT: Motilidad / OR

P: Mirabilis usualmente es negativa.

E: Cloacae negativo.

P: Vulgaris es negativo – la reacción es de desanimación.

S: S. paratyphi A. es negativa.

P: Mirabilis es positiva.

TSI / KIA

A: Acidificación.

AL: Alcalinización. N: Ornitina.

R: No Realizado

V: Variable.

P: Mirabilis, usualmente es negativo.

S: S. Typhi, S. Pratyphi A son negativos

P: Vulgaris usualmente es negativa

IN: Inalterado.

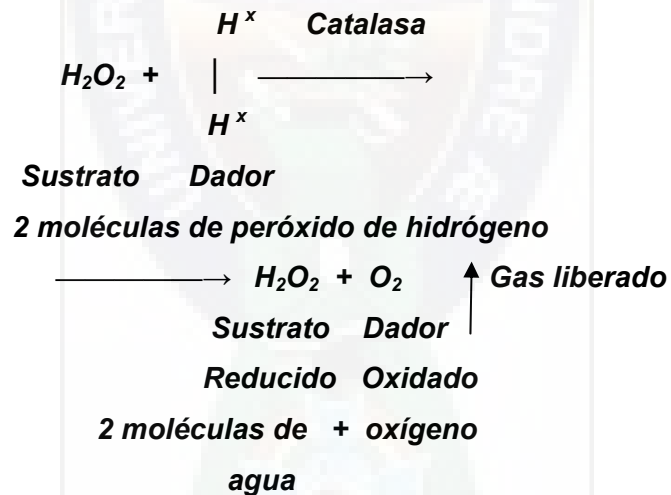
B. COCOS GRAM (+)

PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE IDENTIFICACIÓN

1. PRUEBA DE LA CATALASA

Material	Reactivos
Para objetos Asa bacteriológica Aplicadotes estériles	Peróxido de hidrógeno 10 Vol.

FUNDAMENTO.



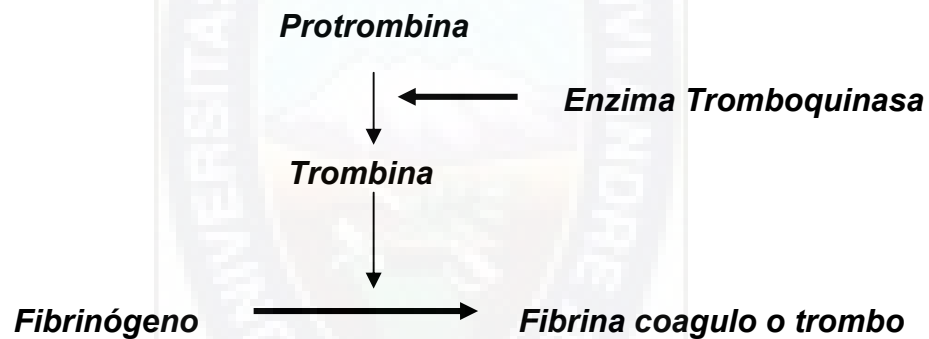
PROCEDIMIENTO.

- Con un asa bacteriológica recoger una colonia pura de 18 24 horas de incubación (de la parte central de la colonia evitando arrastrar el medio).
- Colocar la colonia en un porta objetos.
- Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 10 vol., sobre la colonia.

1.1. PRUEBA DE LA COAGULASA

LIGADA Y LIBRE

Material	Equipo	Reactivos
Tubos de hemólisis Porta objetos Pipetas 1 ml.	Estufa a 35° C	Plasma citrato Agua destilada estéril



Procedimiento:

En porta objeto (coagulasa ligada)

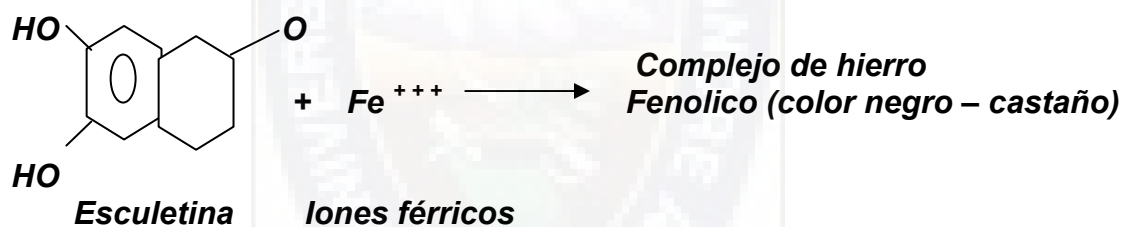
- Colocar una gota de agua destilada estéril o solución fisiológica en un porta objetos limpio.
- Añadir una asada de colonias puras, emulsionar suavemente.
- Colocar en el mismo porta objetos el control positivo para realizar la prueba simultáneamente en tubo (coagulasa ligada y libre.
- A un tubo de ensayo limpio, colocar 0.5 ml. De plasma citratado u oxalatado.

- Añadir 0.5 ml de un suspensión de cultivo puro, mezclar suavemente por inversión (no agitar)
- Incubar en baño maría a 35° C, durante 4 horas controlar cada 30 minutos si hay coagulación.

1.3 PRUEBA DE LA BILIS ESCULINA

Material	Equipo	Reactivos
Tubos de tapa rosca Aguja bacteriológica	Estufa a 35° C	Medio de bilis esculina

Fundamento:



Procedimiento:

- Se inocula dos o tres colonias al medio de bilis esculina por punción vertical con aguja.
- Incubar a 35° C durante 24 horas

1.4 PRUEBA DE TOLERANCIA AL CINa AL 65%

Material	Equipos	Reactivos
Tubos con tapa de rosca Asa bacteriológica	Estufa a 35° C	Medio base para enterococo

Fundamento:

Es la capacidad que presentan especies del grupo enterococo y no enterococo para soportar concentraciones elevadas de cloruro de sodio.

Procedimiento:

- Inocular dos o tres colonias de estreptococos en caldo o agar de CNa al 6.5%
- Incubar 24 hrs. A 35° C en atmósfera normal o que contenga más CO₂.

Lectura:

Examinar el crecimiento, indicando por enturbiamiento y a veces por el cambio de color del indicador.

1.5. PRUEBA DE LA BATRICINA

Material	Equipos	Reactivos
Caja petri – agar sangre Asas bacteriológicas.	Estufa a 35° C	Disco bacitracina de 0.04 ug.

Fundamento:

Es la inhibición del crecimiento que se presenta en los estreptococos del grupo A al ser confrontados con discos de bacitracina de 0.04 U.I.

Procedimiento:

- A partir de un cultivo puro de 24 hrs., sembrar en grilla.
- Colocar el disco de bacitracina al centro de la siembra.
- Incubar a 35° C durante 18 a 24 hrs.

Lectura:

Observar la formación de halo de inhibición o resistencia.

1.6. PRUEBA DE CAMP – TEST

Material	Equipos	Reactivos
Caja petri – agar sangre Asas bacteriológicas.	Estufa a 35° C	Capas de <i>S. aureus</i> .

Fundamento:

El factor CAMP es una sustancia extracelular producida por estreptococos del grupo B que incrementa la lisis de los eritrocitos por la B-lisina estafilocócica y que produce una típica hemólisis en forma de punta de flecha.

Procedimiento:

- Sembrar una estría de estreptococo perpendicular a la de *Staphylococcus aureus* en una placa de agar sangre.

- Incubar a 35° C por 24 horas.

VI. ANTIBIOGRAMA

MEDIO PARA LA SIEMBRA:

Se recomienda el empleo de Agar **MUELLER HINTON** posee un bajo nivel de inhibidores de sulfas tetraciclinas. Es importante medir el P^H del medio, su rango debe estar entre 7.2 y 7.4. Corregir el P^H si está por debajo de 7.2 (con una base NaOH, 1 normal); y si está por encima de 7.4 (con un ácido como el HCl 0.1 normal). La profundidad estandarizada es de 4 mm (30 – 32 ml). Evitando que se formen gotas de condensación en la superficie del medio.

Procedimientos:

- Seleccionar 3 – 5 colonias de la misma morfología.
- Transferir las colonias con un Isopo en solución Fisiológica.
- Con el patrón de turbidez = escala de MC. Farland ($1.5 \cdot 10^8$ UFC/m).
- Estandarizar la suspensión del Inóculo y homogenizar, introduciendo el isopo estéril en la suspensión.
- Sembrar suavemente en la superficie del medio (Mueller Hinton), con una distribución homogénea del Inóculo.
- Sacar los antibióticos dos horas de ser utilizados.
- Colocar los discos sobre la superficie del agar, presionar ligeramente sobre el disco para que no se despegue.
- La distancia entre disco y disco debe ser de 2.5 cm. Y de disco al borde de la caja de 2 cm.
- Una vez colocado el disco no debe ser removido, pues inmediatamente difunde el antimicrobiano sobre el agar.— Incubar a 37° C 12 horas.

— Medir los diámetros de inhibición (normas de la N.C.C.L.S).

Cuadro No. 2 ANTIBIÓTICOS SUGERIDOS PARA ENSAYAR CON FINES TERAPÉUTICOS EN INFECCIONES URINARIAS:

AGENTE PATOGENO	ANTIBIÓTICO RECOMENDADO
Escherichia coli	Gentamicina. Amikacina. Cefotaxima. Nitrofurantoina. Norfloxacin. Ciprofloxacina. Trimetropin Sulfametoxazol. Amoxicilina / Clavulánico.
Klebsiella	Gentamicina. Cefalosporinas.
Proteus	Ampicilina. Amoxicilina Gentamicina. Cefalosporinas
Streptococcus faecalis	Amoxicilina. Ampicilina.
Pseudomona	Gentamicina Amikacina

ANEXOS



CONTROL DE CALIDAD DE DISCOS

Antimicrobiano	Discos	E. Coli ATCC 25922 (Halo mm)	E. Coli ATCC 25922 (Halo mm)
Ampicilina	10 ug	16 – 22	27 – 35
Cefalotina	30 ug	15 – 21	29 – 37
Cefuroxima	30 ug	20 – 26	27 – 35
Cefotaxima	30 ug	29 – 35	25 – 31
Cloranfenicol	30 ug	21 – 27	19 – 26
Gentamicina	10 ug	19 – 26	19 – 27
Tetraciclina	30 ug	18 – 25	24 – 30
Norfloxacina	10 ug	28 – 35	17 – 28
A. Nalidixico	30 ug	22 – 28	–
Eritromicina	15 ug	–	22 – 30

AGAR CLED

Componentes	Gramos(gr)
Peptoma	4.0
Extracto de carne	3.0
L – Cistina	0.128
Tripteína	4.0
Azul de Bromo Timol (indicador)	0.02
Lactosa	10.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml.

P^H final = 7.3 ± 0.2

Preparación:

Suspender 36.2 gramos de polvo por litro de agua destilada, dejar reposar 5 minutos y calentar suavemente agitando por rotación. Hervir 1a2 minutos hasta su disolución total. Distribuir y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 118° C.

Característica del medio: Medio preparado color verde.

Conservación:

Refrigerar para su empleo (2 – 8° C) además protegido contra la luz (bolsa nylón) o papel madera.

AGAR NUTRITIVO

Componentes	Gramos(gr)
Pluripeptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Cloruro de Sodio	8.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml.

P^H final = 7.3 ± 0.2

Preparación:

- Pesar la cantidad con exactitud, tal como se indica en el prospecto.
- Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
- Calentar suavemente hasta la disolución.
- Esterilizar en auto clave a 121° C, 15 minutos.
- Refrigerar para su conservación (2 – 8° C), Al abrigo de la luz.

AGAR MAC CONKEY

Componentes	Gramos (gr.)
Digerido pancreático de gelatina	17.0
Digerido pancreático	1.5
Digerido peptico de tejido animal	1.5
Cloruro de Sodio	5.0
Agar	13.5
Lactosa	10.0
Sales biliares	1.5
Rojo neutro (indicador)	0.03
Cristal violeta	0.001
H ₂ O destilada	1000 ml.

Preparación:

- Pesar la cantidad con exactitud, tal como se indica en el prospecto.
- Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
- Calentar suavemente hasta la disolución.

Método de Esterilización:

Auto clave. 121° C , 15 minutos

Conservación:

Enfriar, verter el medio a las cajas petri, evitando la formación de agua de condensación refrigerado (2 – 8° C) y protegido contra la luz.

TSI (AGAR HIERRO TRIPLE AZÚCAR)

Componentes	Gramos (gr.)
Extracto de carne	3.0
Pluripeptona	20.0
Cloruro de Sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Glucosa	1.0
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de Sodio	0.2
H ₂ O destilada	1000 ml.

Hidratos de Carbono:

Lactosa	1 %
Glucosa	0.1%
Sacarina	0.1 %

Preparación:

- Pesar exactamente las cantidades de acuerdo con las indicaciones del prospecto.
- Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Distribuir en tubos aproximadamente 5 ml., por tubo

Método de esterilización:

Auto clave 121° C; 15 minutos.

- Dejar enfriar en posición indicada (pico de flauta) con una capa basal profunda.

SIMMONS CITRATO AGAR

Componentes	Gramos (gr.)
Glucosa de Sodio	3
Glucosa	0.2
Extracto de levadura	2.0
Citrato de Sodio	1.0
Fosfato monoamónico	1.0
Sulfato de magnesio	0.2
Azul de bromo timol	0.08
Agar	15.0
<i>P^H final = 6.9 ± 0.2</i>	
Agua destilada	1000 ml.

- Pesar exactamente las cantidades de acuerdo a las indicaciones del prospecto.
- Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Distribuir en frascos con tapa a rosca aproximadamente 5 ml.
- Poner en autoclave a 121° C; 15 libras, 15 minutos.
- Refrigerar para su conservación (2 – 8° C)

SIM (SULFURO DE HIDRÓGENO, INDOL. MOTILIDAD)

Componentes: 1. *P^H final 7.3*

Componentes	Gramos(gr)
Estracto de carne	3
Peptona	10
Cloruro de Sodio	5
Agar	4
Agua destilada	1000 ml.

2. *P^H final 7.2*

Componentes	Gramos(gr)
Triptosa	10
Cloruro de Sodio	5
Agar	5
Agua destilada	1000 ml.

Preparación:

- Pesar las cantidades exactamente, tal como se indica en el prospecto.
- Rehidratar con H₂O destilada o desmineralizada.
- Calentar suavemente hasta su disolución.
- Distribuir en tubos, aproximadamente 5 ml. Por tubo.
- Dejar enfriar el medio en posición vertical y refrigerar para su conservación
(2 - 8° C)

UREASA

Componentes	1. P^H final = 6.8 ± 0.2	Gramos(gr)
UREA		20.0
Fosfato		9.1
Fosfato disódico		9.5
Extracto de levadura		0.1
Rojo Fenol		0.01
Agua destilada		1000 ml.

Preparación:

- Pesar las cantidades exactamente de acuerdo a las indicaciones.
- Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
- No calentar para disolver, la Urea se descompone con el calentamiento.

Método de esterilización recomendado:

Filtración:

1. Método del filtro de membrana millipore
 2. Membranas 0.45 u diámetro del poro.
- Distribuir en tubos pequeños (en volúmenes de 3 ml., por tubo estéril)

INDOL DE KOVACS

Ingredientes:

- a) Alcohol amílico o isoamílico.
(Puede sustituirse por alcohol Butilo) 150 ml.
- b) p – dimetilamino – Benzaldehido 10 gr.
- c) Ácido clorhídrico (concentrado) 50 ml.

Preparación:

- Disolver el aldehído en el alcohol
- Agregar lentamente el ácido a la mezcla aldehído – alcohol.

Utilización:

- Agregar 5 gotas de reactivo de Kovacs directamente en un tubo incubado 24-48 hrs.
- Agitar suavemente el tubo.

BILIS ESCULINA

	Gramos(gr)
Peptona	5
Extracto de carne	3
Bilis de buey	40
Esculina	1
Citrato de hierro	0.5
Agar	15
Agua destilada	1000 ml.

Preparación:

- Medir exactamente la cantidad que indica el prospecto.
- Rehidratar con agua destilada o desmineralizada.
- Calentar suavemente la solución.
- Colocar aproximadamente 5 ml. En un tubo con tapa de rosca (16 x125 mm)
- Autoclavar a 121° C, 15 libras, 15 minutos.
- Dejar enfriar manteniendo el tubo inclinado.
- Refrigerar para su conservación (2 – 8° C)