



**INSTRUCCION DE TRABAJO PARA
IDENTIFICACION, ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE
RESISTENCIA FARMACOLOGICA ASI COMO
GENERACION Y VALIDACION DE RESULTADOS
DIVISION DE SERVICIOS AUXILIARES DE
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO**

Código: IT-CH-LB-10
Página 1 de 2
Fecha de Revisión: SEP-2018
Versión vigente: 00

INDICE	Pág.
1. ALCANCE.....	1
2. DOCUMENTOS APLICABLES.....	1
3. DEFINICIONES.....	2
4. MATERIAL Y EQUIPO	3
5. DESARROLLO.....	4
6. ANEXOS.....	8
7. CONTROL DE CAMBIOS.....	9

1. Alcance:

Desde la recepción de las cepas puras y aisladas, su preparación , montaje, procesamiento hasta realizar pruebas de resistencia fármacos obtención de resultados y validarlos por parte del Químico/Laboratorista adscrito al laboratorio de bacteriología del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde" (AHCGFAA).

2. Documentos Aplicables:

NOM-007-SSA3-2011 Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

NOM-017-STPS-2008 Equipo de protección personal-selección, uso y manejo en los centros de trabajo.

NOM-087-ECOL-SSA1-2002 protección ambiental, salud ambiental, residuos peligrosos biológicos infecciosos, calcificación y especificaciones de manejo

NOM-065-SSA1-1993 Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo.

IT-CH-LB-04 Instrucción de trabajo para primo aislamiento

PR-CH-LB-06 Procedimiento para la manipulación y desechos de materiales y residuos peligrosos biológico-infecciosos del laboratorio de bacteriología.

N/A manual de usuario del equipo automatizado de identificación y antibiograma

	Elaboró	Revisó	Autorizó
COPIA NO CONTROLADA	QFB Crisóforo Gómez Quiroz <i>Crisoforo</i> Analista	Dr. Sergio Esparza Ahumada <i>[Signature]</i> Jefe del Laboratorio de Bacteriología	Dr. Héctor Morales Villarruel <i>[Signature]</i> Jefe de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Tratamiento

	INSTRUCCION DE TRABAJO PARA IDENTIFICACION, ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE RESISTENCIA FARMACOLOGICA ASI COMO GENERACION Y VALIDACION DE RESULTADOS	Código: IT-CH-LB-10
		Página 2 de 9
	DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: SEP-2018
		Versión vigente: 00

N/A CLSI

N/A bitácora de muestras

3. Definiciones:

Antibiograma Es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones.

Resistencia bacteriana Se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, por ejemplo). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas.

Fármaco Es una molécula bioactiva que en virtud de su estructura y configuración química puede interactuar con macromoléculas proteicas, generalmente denominadas receptores, localizadas en la membrana, citoplasma o núcleo de una célula, dando lugar a una acción y un efecto evidenciable

Antibiótico Es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente son fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias, de ahí que se les conozca como antibacterianos.

BLEE Es una enzima producida por algunas bacterias y es responsable de la resistencia de éstas ante la acción de antibióticos betalactámicos como las penicilinas, las cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (carbapenemasas).

Cepas Población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias

Sensidiscos: Discos de papel especial impregnados con una cantidad de antibiótico utilizados para la realización de antibiograma de microorganismos

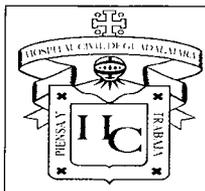
Panel Porción, generalmente cuadrada o rectangular, de una pared, puerta u otra superficie, que está limitada mediante molduras o franjas.

Solución salina Es una disolución acuosa de sal de mesa en agua, hasta cierto grado compatible con los organismos vivos debido a sus características definidas de osmoticidad, pH y fuerza iónica.

Nefelómetro Es un instrumento para medir partículas suspendidas en un líquido o en un gas, para lo que utiliza una fotocelda colocada en un ángulo de 90° con respecto a una fuente luminosa. La densidad de partículas es función de la luz reflejada por las partículas hacia la fotocelda.

Escala de Mcfarland Se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a

COPIA NO CONTROLADA



**INSTRUCCION DE TRABAJO PARA IDENTIFICACION,
ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE RESISTENCIA
FARMACOLOGICA ASI COMO GENERACION Y
VALIDACION DE RESULTADOS**

**DIVISION DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO
Y TRATAMIENTO**

Código: IT-CH-LB-10

Página 3 de 9

Fecha de Revisión: SEP-2018

Versión vigente: 00

10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos

Meropenem Es un antibiótico de amplio espectro, utilizado para tratar una gran variedad de infecciones, como meningitis y neumonía.

Colistina Es un antibiótico producido por ciertas cepas de la bacteria Paenibacillus . La colistina es una mezcla de poli péptido cíclico colistin A y B

Carbapenemasa Son enzimas que en la mayor parte de los casos hacen que la enterobacteria sea resistente a los carbapenems, que son un grupo de antibióticos betalactámicos de última línea terapéutica; es decir, que se reservan para tratar infecciones que no son sensibles a otros antibióticos.

4.- Material y Equipo:

- Bitácora
- Cepas microbiológicas
- Nefelómetro
- Aplicador de madera
- Equipo automatizado para identificación y antibiograma
- Solución salina estéril
- Panel de identificación
- Panel de antibiograma
- Tubo de ensayo plástico
- Dispensador semiautomático
- Equipo de cómputo
- Sensidiscos de meropenem
- Sensidisco de colistina
- Micro pipeta semiautomática 1 ml
- Medio de cultivo Mueller Hinton
- Medio de cultivo agar sangre
- Hispo estéril
- Pinzas de disección metálicas
- Incubadora
- Reactivo A (solución de trabajo)
- Reactivo B (solución de trabajo mas antibiótico)
- Reactivo C (solución de lisis)
- Agitador automático
- Caldo soya tripticasa
- Caldo Mueller Hinton con cationes ajustados
- Hisopo estéril
- Guantes de látex

COPIA NO CONTROLADA



**INSTRUCCION DE TRABAJO PARA IDENTIFICACION,
ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE RESISTENCIA
FARMACOLOGICA ASI COMO GENERACION Y
VALIDACION DE RESULTADOS**

**DIVISION DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO
Y TRATAMIENTO**

Código: IT-CH-LB-10

Página 4 de 9

Fecha de Revisión: SEP-2018

Versión vigente: 00

5. Desarrollo:

No.	Responsables	Descripción de la Actividad						
5.1	Químico /Laboratorista	Recibe y revisa las cepas que entrego el encargado del primo aislamiento, que contengan colonias asiladas, de buen crecimiento y puras.						
		<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">¿Colonias aisladas, buen crecimiento y puras?</td> <td style="width: 40%;">Entonces</td> </tr> <tr> <td>Si</td> <td>Continúa 5.3</td> </tr> <tr> <td>No</td> <td>Se rechaza ase solicita una nueva resiembra o 24 horas mas</td> </tr> </table>	¿Colonias aisladas, buen crecimiento y puras?	Entonces	Si	Continúa 5.3	No	Se rechaza ase solicita una nueva resiembra o 24 horas mas
		¿Colonias aisladas, buen crecimiento y puras?	Entonces					
		Si	Continúa 5.3					
No	Se rechaza ase solicita una nueva resiembra o 24 horas mas							
Nota: las cepas no deben tener un crecimiento mayor a 48 horas								
5.2	Químico /Laboratorista	Procede a acomodarlas por fecha de captura en el sistema de registro y tipo de microorganismo						
5.3	Químico /Laboratorista	Anota en la N/A bitácora de muestras, el número completo de todas las muestras y tipo de microorganismo que serán procesadas en el día.						
5.4	Químico /Laboratorista	Coloca la cantidad de tubos de ensayo plasticos necesario en los trenes de carga del equipó automatizado. Nota: por muestra se utilizaran 2 tubos de ensayo por tren de carga son 7 muestras.						
5.5	Químico /Laboratorista	Llena un tubo por muestra con 3 ml de solución salina con el dispensador semiautomático. Nota: repite el procedimiento con cada muestra						
5.6	Químico /Laboratorista	Toma con un aplicador de madera una o varias colonias según se lo necesario y las coloca en el tubo de ensayo que contiene los 3 ml de solución salina.						
5.7	Químico /Laboratorista	Agita vigorosamente el aplicador de madera dentro del tubo de ensayo para desprender y homogenizar la muestra.						
5.8	Químico /Laboratorista	Enciende el nefelómetro calibra en 0 con un tubo con agua destilada						

COPIA NO CONTROLADA



**INSTRUCCION DE TRABAJO PARA IDENTIFICACION,
ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE RESISTENCIA
FARMACOLOGICA ASI COMO GENERACION Y
VALIDACION DE RESULTADOS**

**DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO
Y TRATAMIENTO**

Código: IT-CH-LB-10

Página 5 de 9

Fecha de Revisión: SEP-2018

Versión vigente: 00

		<table border="1"> <tr> <td>¿Nefelómetro calibrado?</td> <td>Entonces</td> </tr> <tr> <td>Si</td> <td>Continúa en 5.</td> </tr> <tr> <td>No</td> <td>Repetir hasta lograr la calibración en 0.</td> </tr> </table>	¿Nefelómetro calibrado?	Entonces	Si	Continúa en 5.	No	Repetir hasta lograr la calibración en 0.
¿Nefelómetro calibrado?	Entonces							
Si	Continúa en 5.							
No	Repetir hasta lograr la calibración en 0.							
5.9	Químico /Laboratorista	Introduce el tubo de ensayo con la muestra homogenizada al nefelómetro.						
5.10	Químico /Laboratorista	<p>Verifica que la concentración se la adecuada en la escala de Mc farland según el microorganismo.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacilos gram - /coco gram + (0.5 - 0.63) • Levaduras (1.85- 2.07) • Haemophilus influenzae (2.7 - 3.00) <table border="1"> <tr> <td>Concentración adecuada?</td> <td>Entonces</td> </tr> <tr> <td>Si</td> <td>Continua 5.11</td> </tr> <tr> <td>No</td> <td>Repetir desde 5.5</td> </tr> </table> <p>Nota: repetir el proceso con todas las muestras</p>	Concentración adecuada?	Entonces	Si	Continua 5.11	No	Repetir desde 5.5
Concentración adecuada?	Entonces							
Si	Continua 5.11							
No	Repetir desde 5.5							
5.11	Químico /Laboratorista	<p>Selecciona panel de identificación y panel de identificación según sea el microorganismo.</p> <p>Nota: los paneles deben estar atemperados 30 min después de refrigerados</p>						
5.12	Químico /Laboratorista	Abre el paquete, toma e Introduce el panel de identificación y lo inserta en el tubo de ensayo con la muestra y los 3 ml de solución salina a la concentración requerida.						
5.13	Químico /Laboratorista	<p>Abre el paquete, toma e introduce el panel de antibiograma en el tubo vacío correspondiente a la muestra.</p> <p>Nota: repetir este proceso con todas las muestras, se recomienda no tardar más de 15 min durante el proceso desde la inoculación de la muestra en la solución salina</p>						
5.14	Químico /Laboratorista	Completa el tren de carga con sus paneles de identificación y antibiograma correcto colocados en cada muestra.						
5.15	Químico /Laboratorista	Coloca el tren de carga en el equipo de registro de muestras.						

COPIA NO CONTROLADA

	INSTRUCCION DE TRABAJO PARA IDENTIFICACION, ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE RESISTENCIA FARMACOLOGICA ASI COMO GENERACION Y VALIDACION DE RESULTADOS	Código: IT-CH-LB-10
		Página 6 de 9
	DIVISION DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: SEP-2018
		Versión vigente: 00

5.16	Químico /Laboratorista	Lee el código de barras de cada panel correctamente de cada muestra. Nota: se deberá leer primero el panel de identificación y después el de antibiograma.				
5.17	Químico /Laboratorista	Retira el tren de carga una vez leído y registrado todos los códigos de barras de los paneles dispuestos en el tren de carga.				
5.18	Químico /Laboratorista	Ingresa el tren de carga en la bandeja de entrada del equipo automatizado de identificación y antibiograma.				
5.19	Químico /Laboratorista	Procesa las muestras. Ver N/A manual del usuario del equipo automatizado para identificación y antibiograma.				
5.20	Químico /Laboratorista	Obtiene resultados de las muestras procesadas el día anterior.				
5.21	Químico /Laboratorista	Coteja el resultado de identificación arrojado por el equipo contra las morfologías de la muestra procesada.				
		<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">¿Morfología corresponde al resultado arrojado?</td> <td>Entonces</td> </tr> <tr> <td>Si</td> <td>Continua</td> </tr> <tr> <td>No</td> <td>Realiza resiembra ver it para primo asilamiento y procesa nuevamente</td> </tr> </table>	¿Morfología corresponde al resultado arrojado?	Entonces	Si	Continua
¿Morfología corresponde al resultado arrojado?	Entonces					
Si	Continua					
No	Realiza resiembra ver it para primo asilamiento y procesa nuevamente					
		Nota: este proceso deberá realizarlo personal capacitado y de experiencia.				
5.22	Químico /Laboratorista	Revisa antibiograma arrojado por el equipo				
5.23	Químico /Laboratorista	Separa las cepas que cuenten con resistencia a antibióticos de interés, y realiza re siembra ver (IT-CH-LB-04 Instrucción de trabajo para distribución de muestras y primo aislamiento)				

COPIA NO CONTROLADA



**INSTRUCCION DE TRABAJO PARA IDENTIFICACION,
ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE RESISTENCIA
FARMACOLOGICA ASI COMO GENERACION Y
VALIDACION DE RESULTADOS**

**DIVISION DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO
Y TRATAMIENTO**

Código: IT-CH-LB-10

Página 7 de 9

Fecha de Revisión: SEP-2018

Versión vigente: 00

		Microorganismo	Resistencia
		Enterobacterias	Meropenem resistente Ceftriaxona resistente
		Enterococcus faecium	Vancomicina resistente Linezolid resistente
		Staphylococcus aureus	Oxacilina/cefotitina resistente
		Klebsiella pneumoniae	BLEE positiva Meropenem resistente
		Acinetobacter baumannii	Meropenem resistente
		Pseudomonas aeruginosa	Meropenem resistente.
5.24	Químico /Laboratorista	Valida los resultados de las cepas que no presentan resistencia de interés en el sistema del equipo automatizado	
5.25	Químico /Laboratorista	Realiza una nueva validación para que los resultados sean visibles en el sistema de registro.	
5.26	Químico /Laboratorista	Desecha cepas y material utilizado en el proceso de identificación y antibiograma ver (PR-CH-LB-06 Procedimiento para la manipulación y desechos de materiales y residuos peligrosos biológico-infecciosos del laboratorio de bacteriología).	
5.27	Químico /Laboratorista	Realiza pruebas confirmatorias especiales para las cepas resistentes <ul style="list-style-type: none"> • CarbaNP • Inactivación de carbapenemicos • Cribado de resistencia a colistina Ver anexo 1	
5.28	Químico /Laboratorista	Desecha las cepas y el material utilizado durante el procedimiento de las pruebas confirmatorias especiales. Ver (PR-CH-LB-06 Procedimiento para la manipulación y desechos de materiales y residuos peligrosos biológico-infecciosos del laboratorio de bacteriología).	
5.29	Químico /Laboratorista	Obtiene resultado de las pruebas especiales genera reporte y valida resultados con nombre y firma del responsable, cedula profesional	

COPIA NO CONTROLADA



**INSTRUCCION DE TRABAJO PARA IDENTIFICACION,
ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE RESISTENCIA
FARMACOLOGICA ASI COMO GENERACION Y
VALIDACION DE RESULTADOS**

**DIVISION DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO
Y TRATAMIENTO**

Código: IT-CH-LB-10
Página 8 de 9
Fecha de Revisión: SEP-
2018
Versión vigente: 00

		fecha y hora
--	--	--------------

6. Anexos

1 pruebas confirmatorias de resistencia

CarbaNP

Preparar dos tubos estériles nuevos y etiquetar como

Tubo A: control interno

Tubo B: problema

- Atemperar la solución A y B que se encuentra en refrigeración y congelación respectivamente
- Añadir 200 µl de solución de lisis (reactivo C) en el tubo etiquetado como control interno (tubo A).
- Suspender una azada de la cepa a estudiar en los 200µl de reactivo C y agitar en agitador automático.
- Transferir 100 µl de la suspensión al tubo B (problema).
- Añadir 100µl de reactivo A al tubo A (control interno) y agitar en agitador automático.
- Adicionar 100 µl del reactivo B al tubo B (problema) y agitar en agitador automático.
- Incubar los tubos a 37 °C y revisarlos cada 30 min. Buscar cualquier cambio de color del problema con respecto al control interno. Incubar los tubos hasta 2 hrs.

Inactivación de Carbapenemicos

- re suspender una azada (10µl) de la cepa en el tubo con caldo soya tripticasa y homogenizar la muestra en el agitador automático 10-15 segundos.
- Añadir el disco de Meropenem en la suspensión utilizando pinzas estériles y asegurando que quede completamente sumergido.
- Incubar a 37 +- 2°C durante 4 horas
- Preparar una suspensión de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 con turbidez equivalente al tubo al 0.5 de Mac farland en solución salina.
- En los primero 15 minutos posteriores a la preparación del inculo de *E.coli* inocular la placa de agar Mueller Hinton empleando un hisopo estéril utilizado el método de rutina para difusión de disco.
- Dejar secar la placa de 3-10 minutos antes de colocar el disco de meropenem.
- Remover el disco de Meropenem del caldo utilizando pinzas estériles o empleando un asa bacteriológica. Tener cuidado de quitar el exceso del caldo presionando contra las paredes del tubo.

COPIA NO CONTROLADA

	INSTRUCCION DE TRABAJO PARA IDENTIFICACION, ANTIBIOGRAMA , PRUEBA DE RESISTENCIA FARMACOLOGICA ASI COMO GENERACION Y VALIDACION DE RESULTADOS	Código: IT-CH-LB-10
		Página 9 de 9
	DIVISIÓN DE SERVICIOS AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO	Fecha de Revisión: SEP-2018
		Versión vigente: 00

- Colocar el disco de Meropenem sobre el agar Mueller Hinton previamente inoculado. En una placa 100mm se pueden colocar 4 discos y 8 discos en placas de 150 mm.
- Invertir las placas de Mueller Hinton e incubar de 18-24 hrs a 35 +- 2 °C.
- Al día siguiente medir los halos de inhibición y realice la interpretación. ver CLSI

Cribado de resistencia a la Colistina

- Rotular dos tubos estériles como
A. control crecimiento
B. problema
- Añadir 5 ml del caldo Mueller Hinton a cada uno
- Colocar un sensidisco de colistina en condiciones de esterilidad en el tubo B.
- Incubar por 30 mn a 37 °C o una hora a temperatura ambiente 8oncentracion final de colistina, 2µg/ ml).
- Hacer una suspensión de la cepa a estudiar en 2 ml de solución salina y ajustar al 0.5 de la escala de Mcfarland. (aproximadamente 1.5x10⁸ UFC/mL).
- En los primeros 15 minutos posteriores a la preparación del inculo agregar 17µl de la suspensión bacteriana de la cepa problema a los tubos A y B (5.1 x10⁵ UFC/mL).
- Mezclar suavemente cada tubo e incubar 35 +- 2°C por 18-20 hr.
- Observar el crecimiento al día siguiente y realizar la interpretación. ver CLS

7. Control de Cambios:

Versión Vigente	Fecha	Motivo
00	SEP-2018	Alta del documento

COPIA NO CONTROLADA