

## Ambiente en el laboratorio clínico, colección, procesamiento, análisis de muestras y epidemiología

### Objetivos

1. Aprender a preparar medio de cultivo.
2. Conocer instrumentos y equipos utilizados en los laboratorios clínicos.
3. Adquirir conocimientos en la colección, procesamiento y análisis de muestras.
4. Aprender conceptos básicos y procesos llevados a cabo en el área de la epidemiología.

### I. Preparación de medios de cultivo

Algunos medios de cultivos pueden ser comprados ya hechos, mientras otros pueden ser confeccionados siguiendo la receta encontrada en manuales de medios de cultivos deshidratados y reactivos para microbiología. Los medios de cultivos usados en los laboratorios de microbiología pueden ser confeccionados siguiendo las instrucciones que el fabricante provee en la etiqueta del envase. Sin embargo, hay medios de cultivos que son específicos para grupos de bacterias que muchas veces debe ser realizado añadiendo cada componente del medio de forma individual y detallada para que sea más efectivo para la recuperación del microorganismo.

Hay factores que influyen en el crecimiento del microorganismo en el medio como es: 1) la disponibilidad de nutrientes, gases, humedad, 2) las temperaturas adecuadas, 3) técnicas asépticas. Los medios deben tener fuentes de carbono, hidrógenos, nitrógeno, azufre, fósforo, sales como calcio, manganeso, sodio y potasio que son los componentes que son usados por el microorganismo para el desarrollo de componentes celulares. Para las bacterias aeróbicas el aire es el gas que le provee el oxígeno que requieren. La humedad en la atmósfera se provee artificialmente cuando los microorganismos crecen en incubadoras a través de envases abiertos con agua o algodón húmedo colocados en los medios. Algunos medios son líquidos y son conocidos como caldo, pero hay medios sólidos y semi-sólidos por la adición de agar o gelatina como agentes que solidifica.

Para confeccionar un medio de cultivo se debe calcular cuánto volumen total se desea hacer para poder saber cuántos gramos del medio de cultivo se necesita. Por ejemplo: Si deseo hacer 50 platos Petri de agar nutritivo y cada plato Petri contiene 15ml de medio. La receta en el envase del medio indica que son 25gramos del medio para 1 litro de medio.

$$\frac{25 \text{ gramos agar nutritivo}}{1000 \text{ ml medio}} = \frac{50 \text{ platos (15ml cada plato)} = 750 \text{ml (volumen total a realizar)}}{750 \text{ml medio que voy hacer}} \times X \text{ gramos agar nutritivo necesito}$$
$$X = (0.025) 750$$
$$X = 18.75\text{g}$$

### Práctica:

**A. Confección los medios: “Snyder Test Agar” en tubo, “Manitol Salt Agar” (MSA) en plato, “Antibiotic médium”, “Bile esculine agar” en tubo y “Tryptic Soy Agar” en plato y en tubo inclinado.**

#### **A. Difco Snyder Test Agar (65gramos/1000ml)**

1. Calcular los gramos que se requieren para hacer \_\_\_ tubos de ensayos que contienen 6ml de medio cada uno.
2. Añada \_\_\_ mL de dH<sub>2</sub>O en un matraz de \_\_\_ mL y coloque un magneto.

3. Añada \_\_\_ g de agar al agua mientras se agita suavemente y calentándose en un “hot/stirrer”.
4. Agite continuamente y caliente hasta que el medio se vea translucido. No hervir.
5. Pase 6ml del medio a cada tubo de ensayo usando una pipeta serológica con su pompa. Tape los tubos de ensayos al finalizar y coloque un pedazo de indicador de esterilización sobre las tapas de los tubos. Los tubos deben estar colocados en una gradilla.
6. Esteriliza los tubos en una autoclave a un ciclo de 15 min a 121C° y 15 p.s.i. Este paso se realizará con la técnica del laboratorio.  
Una vez finalizado el ciclo, espere que baje la temperatura y la presión en el autoclave para poder abrirlo. No deje que se enfrie ya que se solidificará. Utilice agarradera o guantes para el calor cuando este manejando los tubos con el medio caliente.

**B. Difco Mannitol Salt Agar (111 gramos/1000ml)**

1. Calcular los gramos que se requieren para hacer \_\_\_ platos Petri que contienen 20 ml de medio cada uno.
2. Añada \_\_\_ mL de dH<sub>2</sub>O en un matraz de \_\_\_mL y coloque un magneto.
3. Añada \_\_\_ g de agar al agua mientras se agita suavemente y calentándose en un “hot/stirrer”.
4. Agite continuamente y caliente hasta que el medio se vea translucido. No hervir.
5. Tape con un pedazo de papel de aluminio el matraz y coloque un pedazo de indicador de esterilización.
6. Esteriliza el matraz en una autoclave a un ciclo de 15 min a 121C° y 15 p.s.i. Este paso se realizara con la técnica del laboratorio. Una vez finalizado el ciclo, espere que baje la temperatura y la presión en el autoclave para poder abrirlo.
7. Se deja enfriar un poco el medio cuando sale del autoclave para servirlo, pero no deje que se enfrié mucho ya que se solidificará. Se vierte aproximadamente 25 ml del medio por plato Petri usando técnicas asépticas (área limpia, manos limpias, mechero prendido, flamear la boca del matraz, no abrir mucho el plato Petri al servir).
8. Dejar que se solidifique a temperatura ambiente antes de guardarlos en la nevera. Utilice agarradera o guantes para el calor cuando este manejando el matraz con el medio caliente.

**C. Difco Tryptic Soy Agar ( 40 gramos/1000ml) para platos Petri**

1. Calcular los gramos que se requieren para hacer \_\_\_ platos Petri que contienen 20 ml de medio cada uno.
2. Añada \_\_\_ mL de dH<sub>2</sub>O en un matraz de \_\_\_mL y coloque un magneto.
3. Añada \_\_\_ g de agar al agua mientras se agita suavemente y calentándose en un “hot/stirrer”.
4. Agite continuamente y caliente hasta que el medio se vea translucido. No hervir.
5. Tape con un pedazo de papel de aluminio el matraz y coloque un pedazo de indicador de esterilización.
6. Esteriliza el matraz en una autoclave a un ciclo de 15 min a 121C° y 15 p.s.i. Este paso se realizara con la técnica del laboratorio. Una vez finalizado el ciclo, espere que baje la temperatura y la presión en el autoclave para poder abrirlo.

7. Se deja enfriar un poco el medio cuando sale del autoclave para servirlo, pero no deje que se enfríe mucho ya que se solidificará. Se vierte aproximadamente 25 ml del medio por plato Petri usando técnicas asépticas (área limpia, manos limpias, mechero prendido, flamear la boca del matraz, no abrir mucho el plato Petri al servir).
8. Dejar que se solidifique a temperatura ambiente antes de guardarlos en la nevera. Utilice agarradera o guantes para el calor cuando este manejando el matraz con el medio caliente.

**D. Difco Antibiotic médium 1 (30.5gramos/1000ml)**

1. Calcular los gramos que se requieren para hacer \_\_\_ platos Petri que contienen 20 ml de medio cada uno.
2. Añada \_\_\_ mL de dH<sub>2</sub>O en un matraz de \_\_\_ mL y coloque un magneto.
3. Añada \_\_\_ g de agar al agua mientras se agita suavemente y calentándose en un “hot/stirrer”.
4. Agite continuamente y caliente hasta que el medio se vea translucido. No hervir.
5. Tape con un pedazo de papel de aluminio el matraz y coloque un pedazo de indicador de esterilización.
6. Esteriliza el matraz en una autoclave a un ciclo de 15 min a 121C° y 15 p.s.i. Este paso se realizara con la técnica del laboratorio. Una vez finalizado el ciclo, espere que baje la temperatura y la presión en el autoclave para poder abrirlo.
7. Se deja enfriar un poco el medio cuando sale del autoclave para servirlo, pero no deje que se enfríe mucho ya que se solidificará. Se vierte aproximadamente 25 ml del medio por plato Petri usando técnicas asépticas (área limpia, manos limpias, mechero prendido, flamear la boca del matraz, no abrir mucho el plato Petri al servir).
8. Dejar que se solidifique a temperatura ambiente antes de guardarlos en la nevera. Utilice agarradera o guantes para el calor cuando este manejando el matraz con el medio caliente.

**E. Difco Tryptic Soy Agar ( 40 gramos/1000ml) para tubo inclinado**

1. Calcular los gramos que se requieren para hacer \_\_\_ tubos de ensayos que contienen 8 ml de medio cada uno.
2. Añada \_\_\_ mL de dH<sub>2</sub>O en un matraz de \_\_\_ mL y coloque un magneto.
3. Añada \_\_\_ g de agar al agua mientras se agita suavemente y calentándose en un “hot/stirrer”.
4. Agite continuamente y caliente hasta que el medio se vea translucido. No hervir.
5. Pase 8 ml del medio a cada tubo de ensayo usando una pipeta serológica con su pompa. Tape los tubos de ensayos al finalizar y coloque un pedazo de indicador de esterilización sobre las tapas de los tubos. Los tubos deben estar colocados en una gradilla.
6. Esteriliza los tubos en una autoclave a un ciclo de 15 min a 121C° y 15 p.s.i. Este paso se realizará con la técnica del laboratorio. Una vez finalizado el ciclo, espere que baje la temperatura y la presión en el autoclave para poder abrirlo. No deje que se enfrie ya que se solidificará. Utilice agarradera o guantes para el calor cuando este manejando los tubos con el medio caliente.
7. Coloque los tubos calientes inclinados en las maderas que se le proveerá. Dejar que se solidifique a temperatura ambiente antes de guardarlos en la nevera.

## II. Ambiente del laboratorio clínico

En un laboratorio clínico se manipula diferentes muestras de pacientes para proveer unos resultados de unas pruebas que ayuden al manejo de la infección. Los datos que se proveen en un laboratorio clínico aportan a la prevención ya que en algunos casos se debe reportar a las agencias pertinentes unas enfermedades específicas para que las agencias de salud del gobierno puedan intervenir. En otros casos los resultados dados por el laboratorio clínico permiten un mejor diagnóstico de la condición o enfermedad del paciente para un mejor tratamiento o manejo. Para poder llevar a cabo la manipulación de las muestras es requerido una serie de equipos y materiales que permite procesar de forma efectiva y tener un resultado.

### A. Equipos y materiales

1. **Incubadora:** utilizadas para crecer microorganismos a temperaturas constante, las mismas puede ser usadas con gases como CO<sub>2</sub>.
2. **autoclave:** instrumento utilizado para esterilizar equipos, materiales, medios y soluciones con alta temperatura (121°C) a una alta presión (15lbs.) y a un tiempo dado (15 minutos) en una cámara con alta humedad.
3. **gabinete microbiológico:** posee un flujo de aire filtrado impulsado desde la parte superior para evitar la entrada de contaminantes al área y una luz UV que ayuda a desinfectar.
4. **centrifuga:** permite separar las muestras en sus componentes principales a través del uso de la velocidad.
5. **hisopos estériles:** usados para la extracción de muestra y en algunos casos vienen en soluciones que permite transportar la muestra tomada.
6. **microscopio:** usado para observar las laminillas realizadas con muestras de los pacientes como es la sedimentación de la orina, conteo de células de la sangre, tinción de muestra.
7. **agujas de inocular:** permite el transferir muestras a medios selectivos y diferenciales que se usan para realizar cultivos ya sea de orina, sangre, esputo, o de cualquier fluido extraído del paciente. Este material puede ser de plástico estériles individuales o de metal reusable.

### Practica:

Van a ver demostraciones de los equipos y materiales discutidos. Se utilizarán el autoclave para la esterilización de medios.

## III. Colecta, procesamiento y análisis de muestras clínicas

Como se colecte la muestra depende que patógeno es posible que se aíse o identifique. Hay muestras que se requiere que se tomen al despertarse el paciente como es la orina y el esputo. Por otra parte, la sangre para cultivo es recomendable que se tome cuando el paciente tenga fiebre.

### A. Tipos de muestra

1. Líquida: Ejemplos: exudados, pus, sangre, esputo, saliva, orina, secreciones
2. Sólida: piel, uñas, cabellos, excreta

### B. Ejemplos de métodos de coleccionar muestras clínicas

1. Orina: Se toma la muestra en un envase estéril descartando los primeros mililitros de orina antes de tomar la muestra en el envase. Se recomienda limpiar el área antes de tomar la muestra y que sea la primera orina de la mañana.
2. muestra de garganta: se usa un hisopo estéril que se pasa por la parte posterior de la faringe, amígdalas y área inflamada. El hisopo es transportado en un envase con un

medio de transporte que puede ser agua salina o amortiguador de fosfato en donde el microorganismo se mantiene vivo pero no crece.

3. esputo: Se colecta preferiblemente en las mañanas en un envase estéril.

4. muestra del canal auditivo externo: Se usa un hisopo estéril que se pasa por el canal auditivo externo para diagnosticar otitis externa.

### **C. Pasos a seguir para la colecta de muestra clínica**

1. Se debe elegir el método adecuado para la muestra a tomar.

2. La muestra se debe colectar antes de cualquier tratamiento con medicamentos.

3. Tomar suficiente muestra para poder hacer el estudio.

4. Tomar información precisa sobre la muestra, por ejemplo, paciente con cirugía X, muestra del brazo derecho.

5. Rotular correctamente la muestra.

6. Transportar la muestra correctamente.

7. Evitar la contaminación.

### **D. Métodos para detectar e identificar el patógeno en la muestra**

1. microscopia: Se realiza tinciones directas a la muestra para observar si hay microorganismos asociados. También se puede realizar tinciones a las bacterias aisladas de la muestras para definir morfología, grupo que pertenece, motilidad, producción de cápsula.

2. cultivar: Aislar y purificar la bacteria para luego se identificada. También, la muestra puede ser inoculada en medios para ver si crece algún microorganismo.

3. método químico: Realizar pruebas bioquímicas a los aislados para su identificación a través de fisiología.

4. pruebas inmunológicas: Se usa pruebas serológicas para identificar antígenos producidos por el microorganismo. Hay otras pruebas que es para identificar anticuerpos para unas enfermedades.

## **IV. Epidemiología**

La epidemiología es el estudio de como ocurre, se distribuye y se determina una enfermedad en una población, al igual que la salud de la población. La epidemiología está vinculada con la salud pública. Se estudia el modo en que se dispersa la enfermedad para poder llegar al origen de la misma y el modo en que fue transmitida. Se busca el reservorio que es el lugar donde el agente infeccioso se encuentra viable y donde puede la población contaminarse. Este puede ser animado (tener vida) o inanimado (sin vida). Ejemplo de animado es el humano, un animal, una planta en cambio inanimada puede ser materia orgánica muerta, suelo. Además, se estudia la transmisión de la enfermedad que puede ser directa de hospedero a hospedero por contacto íntimo de persona a persona como para intercambiar fluidos corporales que ocurre con enfermedades de transmisión sexual. También hay transmisión directa de hospedero a hospedero con contacto no íntimo como es el catarro, la influenza por esparcimiento de gotas o por contacto de áreas contaminadas del cuerpo de la persona. Ejemplo el darle la mano a una persona infectada. Otro ejemplo de transmisión es la indirecta de hospedero a hospedero. En este caso puede haber un vector (un organismo vivo que es portador del patógeno) o un agente inanimado (fómites). Animales como pulgas, garrapatas, perros, gatos, roedores son ejemplos de vectores de enfermedades. Los celulares, libros, colchones de camas, juguetes, instrumentos de cirugía son ejemplos de fómites. El modo en que se estudia en la epidemiología es tomando datos e información sobre la enfermedad en la población ya sea a través de entrevistas a los pacientes,

revisando los registros clínicos de los pacientes como reportes clínicos. Los datos obtenidos se analizan y se interpretan.

**A. Tipos de enfermedades e infecciones:**

1. **infección crónica:** es conocida como larga duración porque el patógeno mantiene un balance con su hospedero tomando del mismo lo que requiere pero tiene una progresión lenta.

2. **infección aguda:** es conocida como de corta duración porque el patógeno afecta rápido y dramáticamente a su hospedero.

3. **esporádica:** es cuando la enfermedad ocurre en un momento dado en un lugar en particular.

4. **endémica:** es cuando la enfermedad está de forma constante en baja incidencia en una población siendo persistente en la población o área geográfica. El patógeno no es muy virulento o la mayoría de la población es inmune al mismo ocasionando bajo números de casos. El paciente afectado por una enfermedad endémica se le conoce como reservorio de la infección porque de este puede infectarse otras personas.

5. **epidemia:** es cuando la enfermedad está en un número alto de individuos de una población de forma simultánea. Se observa un aumento súbito de incidencia de la enfermedad en una población en particular. Por ejemplo, dengue, influenza, zika, cólera, malaria, gonorrea

6. **pandemia:** Es cuando una enfermedad está extendida por todo el mundo causando una alta incidencia. Ejemplo: Sida.

**B. Pasos para seguir en un brote**

**1. Verificar si hay un brote**

Se corroborar que realmente hay un brote que no sean casos esporádicos o casos que no se relacionan.

**2. Verificar el diagnóstico**

Ver si se identificó correctamente la enfermedad usando resultados de laboratorios, visitando a los pacientes y corroborando que las características clínicas consiste con el diagnóstico.

**3. Construir una definición del caso**

Crear los estándares y los criterios a usar para evaluar los casos para poder corroborar que los individuos tienen la condición a evaluar. Aquí se usa criterios clínicos que sean objetivos.

**4. Encontrar los casos y registrar la información**

Buscar información sobre casos similares a los reportados en hospitales, clínicas, oficinas de doctores y laboratorios. También se puede usar las comunicaciones para informar y buscar que las personas reporten sintomatología similares a los casos registrados.

**5. Realizar una descripción epidemiológica**

Analizar los casos y ver qué características son claves entre los casos.

**6. Desarrollar una hipótesis de cómo fue, que ocurrió en el brote, el reservorio, modo de transmisión, factores de riesgo, si fue el lugar donde ocurrió, el periodo de tiempo, los grupos afectados.**

**7. Evaluar las hipótesis**

Se evalúa ya sea comparando la hipótesis con los hechos encontrados o con estadística para cuantificar las relaciones y probabilidad.

**8. Reconsiderar, refinar y volver a evaluar las hipótesis**

**9. Compare y concilie con estudios de laboratorio y del ambiente**

Las evidencias de laboratorios pueden aportar para confirmar sospechas. Los estudios del ambiente en algunos casos dan más información para poder llegar a la causa del brote.

### 10. Implementar medidas de control y prevención

Aunque este paso sea el 10, las medidas de control y prevención se implementan lo antes posible. Si hay medidas de control apropiadas para el brote disponibles aunque la investigación este en sus comienzos, se implementan para la protección de la salud de la población en riesgo. Las medidas de control pueden ser varias y en varios puntos de la cadena de transmisión. Esto incluye el agente, la fuente, el modo de transmisión de la enfermedad, el hospedero, en fin, puntos clave para prevenir más contagios.

### 11. Ejecutar medidas de vigilancia

Monitorear que las medidas de prevención y control se estén implementando. Al igual que las medidas de control y prevención pueden realizarse desde el comienzo de la investigación del brote, la vigilancia desde su implemento debe estar activa. La vigilancia ayuda a corroborar que las medidas de control y prevención estén funcionando y que sean efectivas contra la enfermedad.

### 12. Comunicar los hallazgos

Realizar un reporte que resuma la investigación, los hallazgos y resultados obtenidos. El reporte puede ser realizado oralmente a las autoridades y de forma escrito.

### C. Algunas enfermedades de notificación obligatoria:

- |                               |  |
|-------------------------------|--|
| 1. meningitis                 | 7. Amebiasis   |
| 2. tuberculosis               | 8. conjuntivitis   |
| 3. VIH                        | 9. leptospirosis   |
| 4. Síndrome de Guillain-Barré | 10. rabia  |
| 5. Zika                       | 11. <i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia a vancomicina, meticilina u oxilicina |
| 6. Chinkunguya                | 12. sifilis  |

### D. Practica:

1. Cada estudiante va a tener un vaso rotulado que contiene un líquido incoloro que representa a ellos en una población. Un estudiante va a tener un vaso con una sustancia que equivale a la persona infectada.
2. Cada estudiante van a compartir un poco del contenido de su vaso con un compañero de su mesa (partner) y luego con otros dos de otras mesas. Entre esta dinámica, el estudiante va a recibir y dar un poco del contenido de su vaso, pero sin quedarse sin líquido. Importante: anotar el número de los vasos que recibió y de los vasos que compartió líquido. Que los estudiantes vayan en orden, primero una mesa comparte entre ellos y se levantan y comparten con otros dos de dos distintas mesas. Luego la otra mesa hace lo mismo y luego la otra. Así se hace más organizado y los estudiantes pueden ver y anotar con quienes compartieron.
3. Luego, la/el instructor(a) va añadir 1-2 gotas de fenoftaleina a cada vaso.
4. Deben anotar al lado del número si el líquido cambio de color en la tabla a continuación. Cambio de color es positivo a contagio.
5. Cuente cuantos contagiados totales.

Número del vasos que añadí	Número del vaso que recibí

Número	1era interacción	2da interacción
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		

### Referencias

Cheesbrough, M. (2006). *District laboratory practice in tropical countries: Part 2*. New York: Cambridge University Press.

College of Physicians & Surgeons of Saskatchewan. (2010). *Procedures/guidelines for the microbiology laboratory*.

Difco Laboratories. (1984). *Manual Difco: Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología*. Michigan: Difco Laboratories.

Field Epidemiology Manual. *The role of the clinical microbiology laboratory in infection prevention and control*. Recuperado de: <https://wiki.ecdc.europa.eu/fem/w/wiki/3661.8-1-the-role-of-the-clinical-microbiology-laboratory-in-infection-prevention-and-control>.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. & Clark, D.P. (2012). Epidemiology: In *Brock Biology of microorganisms* (pp.914-943). San Francisco, California: Benjamin Cummings.

U.S. Department of Health and Human Services. (2012). *Principles of epidemiology in public health practice*. Recuperado de <https://www.cdc.gov/opphss/csels/dsepd/ss1978/ss1978.pdf>.



Departamento de Salud del estado libre Asociado de Puerto Rico. (2016). *Orden Administrativa Número 358 para enmendar la orden administrativa núm. 302 del 3 de junio de 2013 sobre el listado de enfermedades y condiciones de salud notificables al Departamento de Salud de conformidad a la ley número 81 del 14 de marzo de 1912, según enmendada, leyes vigentes y la autoridad de confieren las mismas a la Secretaria de Salud.* Recuperado de:

<http://www.salud.gov.pr/Sobre-tu-Salud/Documents/OA%20358%20-%20PARA%20ENMENDAR%20LA%20OA%20302.pdf>.

Science & Health Education Partnership. How does and infectious disease spread? HIV simulation. Recuperado de Science & Health Partnership website:

<http://www.seplessons.org/node/226>.