

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

FOLLA DE ACTIVIDADES (ESTADIA FORMATIVA)

CENTRO DE TRABAJO		TITOR/A DO CENTRO DE TRABAJO
CHOP-Hospital Provincial Laboratorio Microbiología		Jefe Servicio: Dra. Marta G ^a Campello Facultativo: Dra Victoria Pulian Facultativo responsable asignado: Dra Matilde TrigoDaporta
Período	Horario	Áreas ou Departamentos do centro de traballo
11 de abril 2016 a 20 de mayo 2016	9 h. a 13 h	11 y 12 Abril Bacterioloxía xeral. Urocultivos 14 y 15 “ Bacterioloxía xeral. Hemocultivos 18 a 30 Abril Serología y Biología Molecular 2 a 20 Mayo Mycobacterias. PCR

DATA	ACTIVIDADES REALIZADAS
11-4-	<p>Presentación en el laboratorio de Microbiología. (Dra. Pulían) Conocer las diferentes secciones de trabajo del laboratorio de microbiología y los facultativos responsables de las mismas. Organización y localización de las distintas secciones del laboratorio de microbiología. Presentación al facultativo asignado como responsable para formación: Dra Matilde Trigo Daporta.</p> <p>RECEPCION DE MUESTRAS PARA Urocultivos: Zona de Cribado Protocolos y funciones TEL propias de esta sección Observación de recepción de muestras, etiquetado y protocolos de Screening o cribado (Positivo-Negativo) CRIBADO por citometría de flujo (UFM-1000) con canales independientes para bacterias (resultado en uds/ µl) y sedimento que permite uso eficiente de recursos. (Apuntes) PERFIL 1 : Un cribado Negativo se siembra en Agar sangre Un cribado positivo en recuento CPSE Agar + COS</p> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;">  </div> <p>E. Coli, P. Mirabilis E. Faecalis</p>



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

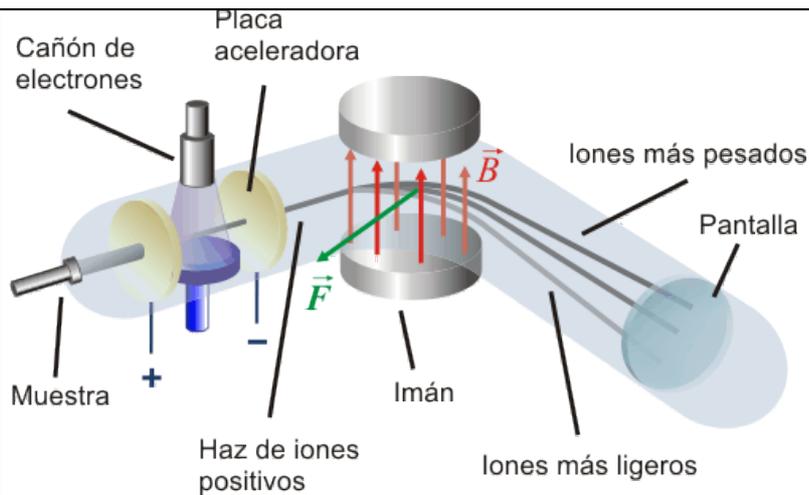
	<p>PERFIL 2 Cribado negativo. No se siembra Cribado positivo recuento y siembra CPSE Agar CULTIVO Interpretación de medio de cultivo cromogénico según color de colonias y tipo de crecimiento (Manual de diagnóstico e instrucciones técnicas de Bacteriología general capítulo 3) Este procedimiento permite discriminar E. Coli y distingue contaminación o no , lo que permite abordar el trabajo a continuar de modo eficiente en el uso de recursos. Rapidez en resultado con diagnóstico y antibiograma en menos de 24 h. ; ojo mucinas presentes en muestra;</p>
12-4	<p>Observación de laboratorio de Biología Molecular. Apuntes de manual técnico de micobacterias. Recepción de muestras biológicas y preparación idónea de las mismas para posterior estudio. Protocolos de actuación. Fases técnicas: Descontaminación/y siembra estudio micobacterias bajo campana (mantener limpia con lejido al 10%) Gestión del sistema Bactec MGIT Protocolos de actuación para diagnóstico de M.tuberculosis complex (Apuntes internos) A Partir de 11h. Laboratorio de bacteriología Xeral: SECCION DE UROCULTIVOS-HEMOCULTIVOS Observación de cultivos positivos y preparación de portas cromogénicas para identificación de colonias por espectrometría de masas. Observación de la preparación de las mismas y procedimiento de lectura en VITEK MS Antibiogramas VITEK-2</p>
14-4	<p>BACTERIOLOGIA XERAL: SECCION PROTEOMICA (Dra Pulian) Sistema de identificación microorganismos (Hongos, Bacterias...) en VITEK MS Sistema basado en espectrometría de masas Plantilla de trabajo de técnicos que reproduce las posiciones de muestras en el porta de identificación. Registro en consola de la posición. La preparación del porta : A partir de cultivo. Con asa de siembra para colonias muy pequeñas (arrastre) y con punta de palillo para colonias grandes (solo una parte de la colonia) Ir con el porta a estación de trabajo: Si el aparato está en proceso no permite acceso Si la casilla aparece negro azulada permite lectura y los resultados son introducidos al sistema o programa MYLA para su validación. PREPARACIÓN TÉCNICA DEL PORTA PARA HONGOS Las placas de cultivo de hongos son selladas con papel de parafilm (siempre) Retirar el film. Picar colonia (Palillo) si esta es grande y si es pequeña con asa.</p>

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>Depositar la colonia en el porta cromogénico en su posición Añadir Ácido fórmico (0,5 µl) cubrir la colonia y dejar secar. El ácido fórmico permite la disolución de la membrana lipídica de hongos y alguna bacteria). Una vez seca Añadir 10 µl del fijador o matriz: aceto nitrilo C10 H7 NO3 Cada 8 muestras poner control (E.Coli) Introducir el porta en el aparato ABRIR Y ADQUISICION El resultado de identificación lo realiza en % cuando de la misma especie identifica 2 en diferentes porcentajes se recoge el identificado en porcentaje mas alto y se vierten los resultados en sistema para validación definitiva o instrucciones del facultativo. (Ver apuntes con el fundamento técnico) .</p>
15-4	<p>BACTERIOLOGIA GENERAL: SECCION DE UROCULTIVOS Y HEMOCULTIVOS (Dra. Pulián)</p> <p>Lectura de placas de cultivo Pruebas bioquímicas a indicación de facultativo (Catalasa/Coagulasa) para la valoración de presencia de estafilococos coagulasa negativos que son indicativos de contaminación por flora de la piel en la toma de muestras. Identificación del microorganismos con relevancia clínica.</p> <ul style="list-style-type: none">• Identificación mediante tarjetas vitek (pruebas bioquímicas) Se preparan inóculos dilución McFarland y se incuban para la lectura de las pruebas bioquímicas. Las tarjetas son distintas para cada grupo de microorganismos y el inóculo que debemos preparar para cada una de ellas también: GN bacilos gram – (inóculo 0,57-0,63) excepto proteus (0,5 a 0,55) GP cocos gram+ (inóculo 0,57-0,63) excepto S.pneumoniae 0,80-0,90 YST levaduras (inóculo 2-2,5) NH identificación Neisseria, Haemophilus y campilobacter inóculo 2,7-3,3 ANC Ident. Anaerobios y Corynebacterium 2,7 a 3,3• Identificación en proteómica por espectrometría de masas en Vitek MS MALDI-TOF)



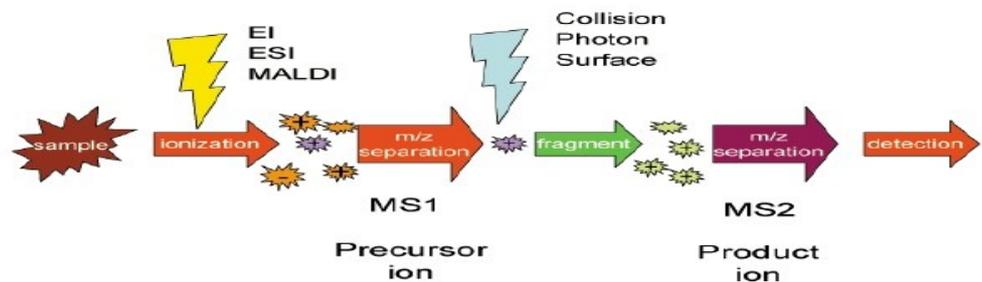
ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos



Fundamento del MS y tecnología MALDI-TOF (apuntes: cociente M/z)

Fundamento

- se introduce una molécula en la cámara de ionización y se bombardea con una corriente de electrones esta sufre la ionización, es decir pierde un electrón dando lugar a la formación de un ión-radical:



El método examina los patrones de proteínas detectadas directamente de la bacteria intacta. Protocolos de preparación de colonias o muestras para posterior estudio con esta tecnología. Cepa control: E. Coli Matriz para proteger biomolécula y para facilitar vaporización y la ionización: aceto nitrilo $C_{10}H_7NO_3$

La cepa control la facilita la casa comercial se siembra en placa de agar sangre y se le dá un pase cada 15 dias el fin de semana a T° ambiente y el resto de los dias a 37°

Esta tecnología acorta la identificación del microorganismo implicado en día y medio, reduciendo costes globales diagnósticos en un 57%.

Tecnología MALDI-TOF (VITEK)

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos



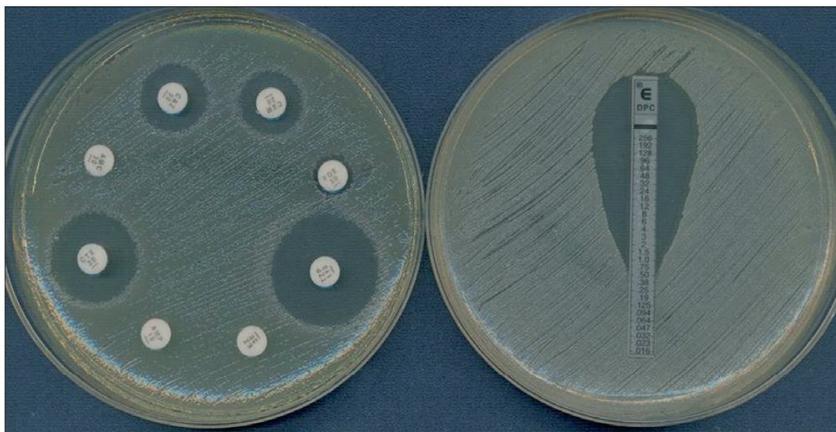
11h. **Sección de Identificación rápida** de Toxina Clostridium difficile, Herpes 1 y 2 mediante IFI, Legionella pneumoniae y S pneumoniae en orina, Estreptococo grupo A , Virus respiratorio Sincital, V.E.B...
Test empleados: test combinados **de Inmunocromatografía, inmunoensayo, determinación de PCR. Anticuerpos monoclonales...**
Normas y procedimientos técnicos (Apuntes) Conservación de muestras.

18-4-

BACTERIOLOGIA GENERAL: UROCULTIVOS SECCION DE ANTIBIOGRAMAS. (Dra. Cortizo)

Preparacion de inóculos, lectura en Vitek-2 Orden facultativa de organización de trabajo.

El sistema vitek-2 no excluye el realizar antibiograma de confirmación para antibioticos concretos y muestras (control facultativo)



Observación de resultados y confirmación de los mismos en técnica manual con disco o bien E.Test del antibiotico (caso de resistencias placa-

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

2 en pagina 4)

Las tarjetas para antibiogramas:

GRAM NEGATIVOS

- AST N244 (orinas gram negativos inoculo 0,57-0,6
- AST N243 : otras muestras Gram – inóculo 0,57-63
- AST N245 y AST-N248 gram negativos no fermentadores

(NF)

GRAM POSITIVOS

- AST-P626 Antib estafilococo (inóculo 0,57-0,63
- AST- P-589 antib. Para enterococo (inóculo 0,57-0,63)
- AST-ST01 antib. Para pneumococo y Streptos (0,57-0,63) excepto para S. Pneumoniae 0,80-0,9

LEVADURAS:

- AST-YS07 antifungigrama inóculo 2-2,5



El inóculo se prepara introduciendo una colonia de la muestra problema con asa en tubo de dilución poniendo el tubo en **DENSIMAT** permite el **dato para ajustar el inóculo según normas (mas diluido o mas concentrado) homogeneizando muestra.**



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos



DENSIMAT

Pasar con una torunda a placa Muller Hinton sembrando del centro a periferia en ambos sentidos.

Introducir discos o tira test (según la resistencia al antibiotico o para confirmar las mismas de resultados aportados por Vitek-2
(Ver apuntes)

CEPAR: guardar (congelación) la cepa resistente antes de envío a laboratorio externo para estudio.

COMO NORMA DE SEGURIDAD Y CUSTODIA TODAS LAS PLACAS SE GUARDAN 48h. TRAS VALIDACION Y RESULTADOS
Al cabo de este tiempo se desechan según normas de retirada de residuos biopeligrosos.

Protocolos para retirada de tubos, placas... a contenedores especiales
(Normas internas en apuntes)

19-4

BIOLOGIA MOLECULAR (bioseguridad-2)

SECCION DE SEROLOGIA (Dra. Matilde Trigo)

Empiezo en estas secciones por un periodo de tiempo de 15 dias.
Soy presentada en estas secciones por la facultativa asignada a la formación Matilde Trigo Daporta.

Atiendo su explicacion de la distribución de las 4 secciones en esta planta y la zona de seroteca (muestras originales congeladas de 1 a 5 años):

- Recepción de muestras: Desde laboratorio central
- Serología automática
- Serología semiautomática
- Biología Molecular

Recepcion de muestras y alicuotas:

tubos primarios recepcionados en 1ª instancia en Laboratorio Central
(visita al laboratorio de donde procesan las muestras)

Comprobación de las muestras /identificación

TEL en Gestión de muestras y volante de petición: normas y criterios de valoración para la no conformidad de muestras (códigos de información de

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

causa) Ver protocolos y normas de actuación.

Detección en esta area de incidencias.

Es necesaria porque las muestras se reciben de area: Montecelo-Hospital ... por circuito interno de transporte para rápido procesamiento.

Preparación de muestras para laboratorio externo. Normas internas de envío. Protocolos de actuación (Ver apuntes)

El envío de muestras a ISC III (Instituto Salud Carlos III está incluido dentro de programa de estudio de vigilancia epidemiológica).

Serologia automática.

Técnicas y equipos de analizadores **Liaison XL e Innolia** en este equipo realiza test de confirmación (VIH, VHC) (fundamento técnico y funcional de estos equipos en apuntes:



QUIMIOLUMINISCENCIA

Partículas recubiertas de Ag. que captura anticuerpos presentes en muestra a valorar tras lavados se añade al conjugado compuesto por anticuerpos monoclonales marcados con un derivado isoluminol y lavados posteriores eliminan el conjugado no unido con lo que al añadir reactivo de Starter se produce reacción colorimétrica medida en el sistema óptico).

Muestra suero o plasma 2-8°C conservación hasta su procesamiento.

Criterios de aceptación/rechazo de muestras (hemolizados, hiperlipemias...)

Test de confirmación de VIH... (ver innolia Score) en tiras de nitrocelulosa: inmunogenetics tiras. **Metodología Inmunoblot** (variación de Westernblot, pero con anticuerpos monoclonales).

Funciones y tareas TEL en protocolos de actuación según muestras y determinaciones.

De esta sección se remiten a laboratorio central aquellas muestras que precisen completar estudio.

Revisión resultados: separa y remite sueros para repetición.

Envío de muestra

Revisa Stok de reactivos.

Serologia semiautomática:

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>Proceso de muestras analizador GENESIS y analizador VIRCLIA (apuntes de los equipos) y TEL protocolos de actuación y normas de funcionamiento (ver)</p> <p>En esta sección tienen técnicas de intervención manual basadas en inmunofluorescencia y aglutinaciones (Rosa bengala, Antígeno criptococo, RPR, TPHA, VDRL ... y semiautomatizadas : galactomano y Quantiferon. (Ver en apuntes con fundamento técnico)</p> <p>Revisión de resultados.</p> <p>Area de biología molecular</p> <p>Se procesan muestras de dos secciones: Micobacterias y serología y biología molecular.</p> <ul style="list-style-type: none">• Extracción de ácidos nucleicos <p>Habilitada una parte aislada de la sección para evitar contaminaciones de la zona de amplificación.</p> <p>Extracción de ADN por partículas magnéticas en Analizador AmpliPlex y Magnapure</p> <ul style="list-style-type: none">• Amplificación <p>Determinaciones PCR a tiempo real</p> <p>Distintos equipos COBAS TAQMAN Smartcycler Fluorocycler, Cobas 4.800 y Ligthcycler.</p>  <p>Detección por PCR a tiempo real de virus: cuantificación de la carga viral VIH, VHB y VHC (para monitorizar tratamientos), detección CMV, virus del papiloma humano....y PCR multiplex para la detección conjunta de varios patógenos en una sólo PCR: PCR virus neurotropos (detecta Virus Herpes Humano, Virus varicela Zoster, y enterovirus en los LCR de muestras con sospecha de meningitis vírica)</p>
21-4-	<p>BIOLOGIA MOLECULAR (bioseguridad 2)</p> <p>SECCION DE SEROLOGIA</p> <p>En esta sección se procesan muestras para determinar:</p> <p>Brucellosis (Ac heterófilos)</p> <p>Hidatidosis(Ac sericos Echinococo granulosis por hemaglutinacion indirecta)</p> <p>Cuantificación de galactamanano (aspergillus equipo Tecan Genesis: metodologia ELISA) . ver técnica en apuntes.</p> <p>VDRL RPR carbon TPHA pruebas treponémicas y no treponemicas para</p>



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

determinación de sífilis.

Borrelia Burqdorferi ,
Chlamydomphila pneumonia (Virclia)
Sarampion.
Virus herpes simple, IgM HSV,
Quantiferon TB,
Latex criptococo,
Tetanos IgG
Test de confirmacion de HBsAg...

Las tecnología utilizada procesa técnicas basadas en reacción antígeno anticuerpo por hemaglutinación indirecta, aglutinacion indirecta, metodología **ELISA** y **Quimioluminiscencia** (automatizadas en Virclia) EQUIPOS descritos en dia anterior.

Observación participante:

proceso de determinación de la técnica **Quantiferon TB** (método ELISA) Obtención de muestra, Preparación de la misma, reactivos, principio y fundamento del test, ejecución técnica y vigilancia.
Resultados (recogidas de notas y apuntes)

Observación participante

Coxiella Para detección por **inmunofluorescencia en departamento oscuro (Microscopia óptica)** para detección

fundamento técnico basado en la reacción de anticuerpos de muestra con antígenos unidos a superficie de portaobjetos (el portaobjetos es especial: socavado para aplicar varias muestras) los anticuerpos específicos presentes en muestra reaccionan con antígenos y las inmunoglobulinas no unidas en reacción son eliminadas en procesos de lavados el complejo formado antígeno-anticuerpo es revelado mediante globulina antihumana marcada con **fluoresceina (verde manzana)**.

En **microscopia fluorescente** observo los resultados: positivo cocos y bacilos fluorescentes dan la imagen de cielo estrellado con coloracion verde y los negativos es un oscuro homogeneo.

Para positivos se realizan diluciones en portaobjetos 1/64 (10 microlitos en 630 microlitos PBS) 1/128 (doblodiluir la anterior)

TECNICA:

Poner 20 microlitros de ambas diluciones en dos pocillos del porta, idem control negativo y positivo. Incubar en cámara húmeda 30' a 37°. Enjuagar el porta con PBS evitar verter directamente PBS sobre pocillos. Sumergir el portaobjetos durante 10' en PBS dar un ligero lavado con agua destilada.

Dejar secar los portaobjetos y añadir 20 microlitros de solución antiIgG humana en cada pocillo.

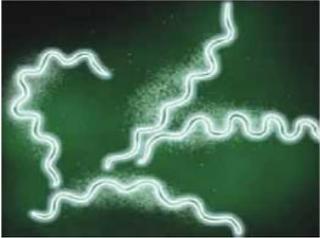
Examinar al microscopio de fluorescencia 400x lo mas rápido posible.

Casos de positivos estudiar muestras hasta diluciones 1/2048

Resultado viene dado por el título de suero en la máxima dilucion que se observe positividad.

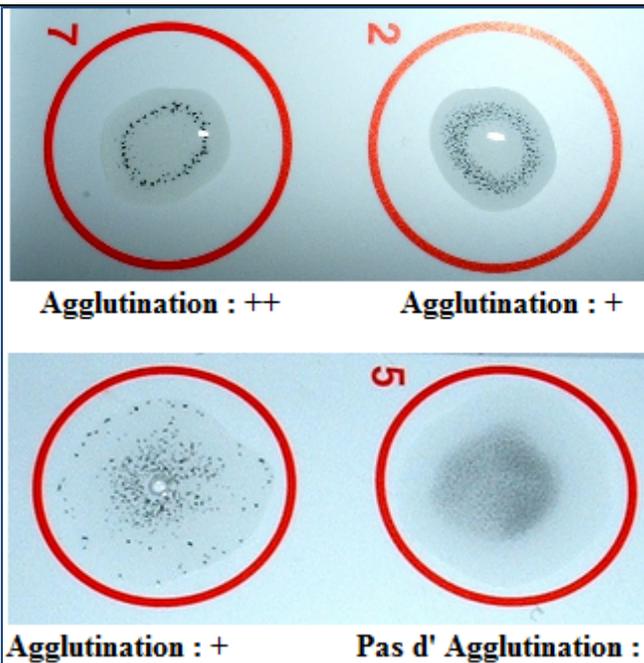
Anticuerpos IgM e IgG se comportan de desigual manera en primo

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

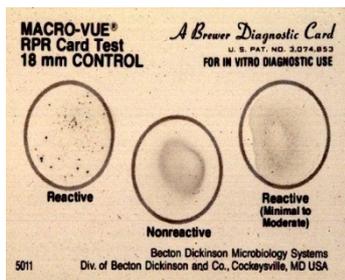
	infección y reinfección
22-4-	<p>BIOLOGIA MOLECULAR SECCION DE SEROLOGÍA</p> <ul style="list-style-type: none">- Apuntes: QUANTIFERON (test determinación de interferon gamma para diagnostico TB método ELISA) Apuntes de la técnica principio e interpretacion de resultados. <p>Serologia diagnóstica de Sífilis: Pruebas para <u>determinar treponema pallidum o anticuerpos del mismo</u></p>  <p>EN APUNTES: Test de determinación. Fundamento de los test aplicación técnica.</p> <p><u>Diferencia test treponémico y no treponemico.</u> Utilidad diagnóstica deteccion por aglutinación indirecta, hemaglutinación indirecta, inmunoensayo quimioluminiscente (determinacion cualitativa de anticuerpos específicos totales dirigidos contra treponema pallidum)</p> <p>Microscopia de campo oscuro: Observacion de movilidad característica</p>  <p>Visualizacion de test VDRL (test no treponemico con falsos positivos por anticuerpos anticardiopina)</p>



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

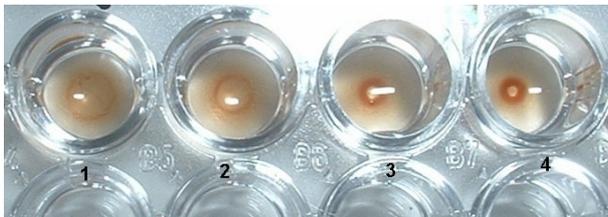


TEST RPR (test no treponemico)



Test treponemico: TPHA FTA-ABS

(Anticuerpos contra bacterias treponema pallidum “fluorescent treponema antibody absorption” muestra secada al aire y fijada con acetona, metanol y calor) EIA (Anticuerpos totales por quimioluminiscencia) detección de anticuerpos específicos totales IgM e IgG.



TPHA. Prueba treponemica hemaglutinación eritrocitos de ave recubiertos de antígenos de treponema pallidum que se unen a anticuerpos específicos presentes en suero problema. El suero se diluye en reactivo de adsorción

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>que es un extrato de cultivo treponemas no patógeno (cepa reiter) De esta manera los anticuerpos que contengan la muestra frente a treponemas no patógeno quedan inactivados en este paso. Reacción positiva aglutinacion de células, negativa sedimentación celular en forma de botón.</p>
<p>Día 25-4</p>	<p>BIOLOGIA MOLECULAR. Bioseguridad-2 EQUIPOS</p> <p>TERMOCICLADOR SMARTH CYCLER Cepheld PCR a tiempo real para enterovirus, varicela, Herpes y virus gripe A realiza PCR: amplificacion y detección a tiempo real y lectura de resultados con respecto a control..</p> <p>LIGHT Cycler 2.0 (ROCHE) PCR a tiempo real para virus de gripe y deteccion y lectura.</p> <p>Equipos TERMOCICLADORES (PCR convencional): para Bordetella y genotipo hepatitis C</p> <p>Equipo APLIED BIOSYSTEMS GENE AMP PCR SISTEM 9.700 PCR convencional, solo amplifica precisa la detección por electroforesis aparte. Estos equipos precisan extracción de ADN en equipo MAGNE PURE compact y biofuge primo Heraeus en habitacion interior de sección, el método de extracción ADN utiliza particulas magnéticas.</p> <p>EQUIPO HAMILTON ROCHE (COBAS) x 480 . Extracción de ADN</p> <p>EQUIPO COBAS Z 480: PCR amplificacion y detección Estos dos equipos anteriores se utilizan para deteccion de virus del papiloma</p> <p>FLUOROCYCLER HainlifSciencie. Termociclador a tiempo real para detección C trachomatis</p> <p>EQUIPO PROFIBLOT T48 TECAN deteccion de genotipo del virus de hepatitis C la deteccion se realiza en tiras de nitrocelulosa.</p> <p>EQUIPO COBAS AMPLIPREP y COBAS TAQMAN (Roche) CoBAS TAQMAN 48 para deteccion de virus VIH, Hepatitis B, C, Citomegalovirus. Equipo cerrado en circuito.</p> <p>técnica:</p> <p>HCV Cuantitative. Prueba de amplificación Acidos nucleicos “in vitro” para detectar cuantitativamente genotipos 1 a 6 del ARN del virus de hepatitis C en suero o plasma conservado en EDTA mediante este equipo. (V. Apuntes del principio y desarrollo técnico: preparación de muestra, transcripción inversa, amplificación mediante PCR, amplificación del fragmento-objetivo, amplificación selectiva de acido nucleico del fragmento-objetivo, deteccion por sondas escindidas doblemente marcadas y cuantitativa del ARN HCV sondas doblemente marcadas por fluorescencia)</p> <p>El ciclo PCR en que se curva el crecimiento adquiere forma exponencial y</p>

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>esta relacionado con la cantidad de material de partida presente al inicio PCR.</p> <p>Reactivos. Composición</p> <p>Protocolos de ejecución técnica de los TEL en estos equipos.</p> <p>A ultima hora de la mañana: determinacion de RPR- carbon de 4 muestras en departamento de serologia.</p>
26-4-16	<p>BIOLOGIA MOLECULAR: Observación técnica participante</p> <p>Determinación GENÓMICA: VIRUS PAPILOMA HUMANO:</p> <p>Screening de aquellas muestras de riesgo bajo y alto preoncologica</p> <p>Genotipo 16 alto progreso a cáncer (mas de 118 genotipos)</p> <p>Muestras recibidas de anatomía patológica en Presert- cyt (conservante alcohólico)</p> <p>VPH no tiene posibilidad de cultivo in vitro, las serología carece de interés diagnóstico, por lo que durante muchos años el diagnóstico ha sido indirecto por citología (papanicolao) por el anatomopatólogo con riesgo de falsos positivo. La incorporación de la PCR al diagnóstico de VPH genómica suponen una eficacia en los programas de detección de cancer cervical y consiguiente reducción de pruebas y tratamientos innecesarios en pacientes.</p> <p>Resultando ADN HPV una prueba de cribado primario de 1ª linea.</p> <p>Técnica: procedimiento automatizado</p> <ul style="list-style-type: none">- Preparación automatizada de muestras para extraer simultaneamente ADN del HPV y ADN celular (EXTRACCIÓN ADN) digestión/desnaturalización de muestra cervix en medio Presert-cyt a temperaturas elevadas y a continuación se procede a lisado con reactivo caotrópico. Purificación de los ácidos nucleicos HPV liberados junto con ADN de la Beta globulina que actúa como control de proceso mediante absorción de partículas magnéticas (Cl2 Mg) posteriormente se lavan y finalmente se separan de dichas partículas. Con lo que queda listo para ser amplificado mediante PCR.- Amplificación mediante PCR de secuencias objetivo de ADN mediante pares de cebadores complementarios para HPV y beta-globulina. Estos cebadores definen una secuencia de 200 nucleótidos de la región polimórfica diseñados para amplificar ADN del HPV de los 14 tipos de alto riesgo (16,18,,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66,68) las sondas de oligonucleotidos fluorescentes se unen a regiones polimórficas de la secuencia definida por dichos cebadores. Amplificación del fragmento objetivo. Utiliza ADN polimerasa químicamente modificada del ADN polimerasa de

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

la especie *Thermus* para secuencia de inicio en caliente de estos fragmentos-objetivos y de la beta globulina. 1.- **Se calienta la mezcla de reaccion de PCR para activar la ADN polimerasa** para desnaturalizar el ADN vírico y ADN genómico y **exponer las secuencias objetivo de cebadores**, 2.- a medida **que se enfria la mezcla de reacción de la PCR tanto en sentido ascendente como descendente** 3.- los cebadores **inician la fase de alineación con las secuencias del ADN objetivo**. La ADN polimerasa en presencia de **metal divalente** y **exceso de dNTP** prolonga los cebadores y **genera la síntesis de la segunda cadena de ADN** con ello se completa el **1º ciclo de PCR que da lugar a copia de ADN bicatenario del fragmento objetivo del genoma HPV** y gen beta-globulina, la ADN polimerasa elonga los cebadores hibridados junto con plantillas objetivo **para producir** una molécula de ADN bicatenario objetivo del HPV de aprox. **330 pares de bases o una molecula de ADN beta-globulina denominada Amplicón**. La amplificación se produce solo en el genoma de HPV y/o en el gen de la beta globulina comprendidos entre el par de cebadores adecuados.

- **Deteccion** a tiempo real de sondas de detección de oligonucleótidos escindidas mediante marcadores fluorescentes específicos para HPV y beta-globulina.

Tratamiento de la muestra:

Homogeneizar muestra. Retirar 2 ml. Tubos identificados recogiendo la muestra limpia:decantando para que el aparato pueda procesar mejor. Si se procesa en vial original:13 ml. **Separación en campana de flujo laminar guantes y mascarilla..**

(COBAS 4.800 HPV test Roche Hamilton)

El volumen de muestra necesaria varia entre un minimo de 1 ml. y máximo de 10 en tubo

Al abrir colocar las tapas de muestra boca arriba en campana.

Poner el rack de tubos en cobas, en la zona iluminada correspondiente, identificar las muestras, permitiendo el Scaneo.

A continuación **selecc. Tipo de muestra en Preser Cyt** . Selección tipo muestras (Specymen) y selección PC

Selecc. Request result tipo de resultado HPV High Risk.

E **introducir materiales**: 2 gradillas con consumibles esteriles en posición demandada por el ordenador de aparato, puntas de pipetas, 8se iluminan espacios de colocación)

Pulsar LOAD consumibles (lectura de los materiales necesarios por codigo de barras.

Introducir reactivos: Wash Buffer (en nevera)

Introducir reactivos para papiloma

Introducir controles: proteinasa K, HPV control posit. Y control Neg.

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

Master Mix (pares de cebadores y sondas específicas para 14 genotipos de HPV de alto riesgo y de beta-globulina), Cl2 Mg y dar Start

Dco CHLAMYDIA Trachomatis (Tricomona)

Muestra:

- Orina (en varones). Conservación entre 2-8°C 48 h. o -20°C 3 o 4 días
- Exudado endocervical 2-8°C 72h.
- Exudado uretral
- Otras: semen, biopsias

3 Procesos:

- Extracción de DNA (duración ½ h.)
- Amplificación y
- detección (en fluroro-Cycler-12)

Reactivos: Fluorlyse 2-8°C (conservación)

Material: tubos ampl. 2 ml. pipetas para dispensar 0,5/10 µl. y 100/1000 µl. (campana bioseguridad) Puntas pipetas con filtro
Control +

EXTRACCION DNA

En esta técnica la extracción es manual



- **Encender termobloque 95°**
- Sacar control interno de congelador y fluorolyse F-Lys F-NB de nevera
- Si la muestra es orina: 0,5 ml. del sedimento criotubo 2 ml.
- Si la muestra es torunda uretral/endocervical lavar la muestra en 500 µl de solución salina fisiológica.
- Centrifugar las muestras 15' a 10.000 g RPM (pasar a xg.)
- Desechar el sobrenadante
- Resuspender (pipeta de pellet) las muestras con 100 µl. de F.Lys + 2 µl

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

- Control Interno (devolverlo al congelador)
- Poner las muestras en termobloque (calor seco) 95°C 5'
- Añadir 100 µl de F-NB y vortear 3'
- Guardar en MICP-CON-16 (congelador) si no procesamos en amplificación y detección

AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN EQUIPO FLUOROCYCLER -12 Hain Lifescience (amplificación y detección)

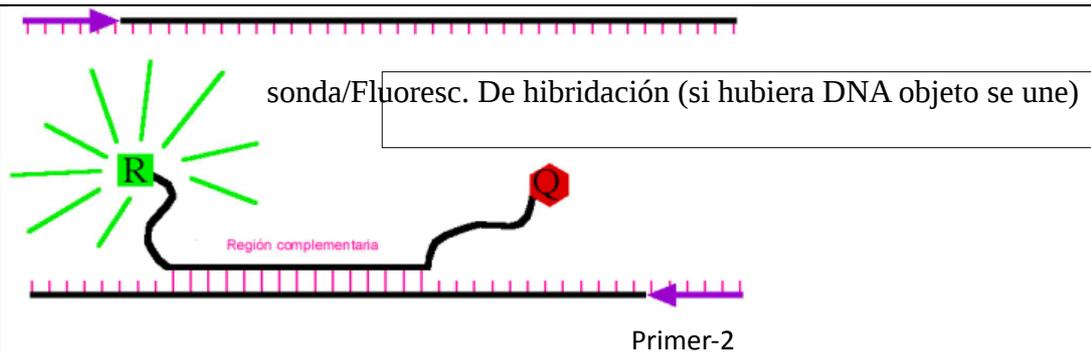


(25 X 25 X 20 cms.)

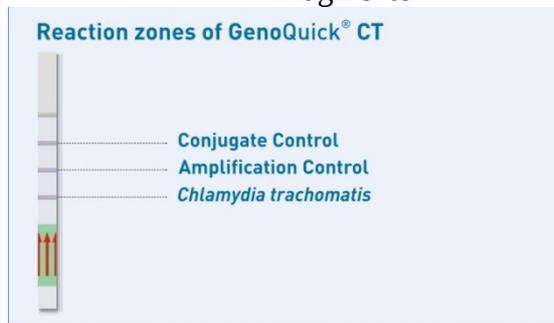
Reactivo: Fluorotype CT (-20°)
Material: microtubo PCR 0,2 ml. c/tapa plana (fluor)
Pipetas para dispensar 0,5/100 20/200 µl (campana) y puntas pipeta con filtro
Preparar el Master-Mix en tubo de eppendorf este es el reactivo que contiene los desoxinucleotidos y enzimas) proporción 3 µl de AM-A + 7 µl AM-B por muestra.
Sacar 20' antes el control+ AM-A y AM-B y poner en bloque frio
Emsamblar microplaca con eppendorf correspondientes (tubos Fluor) para muestras
Orden de colocación: 1º muestras y al final control+
Añadir 10 µl de la master Mix de trabajo a cada tubo 8muestras y control)
Añadir 6 µl de DNA-muestra
Mezclar con pipeta y tapar (sobrenadante)
Rotular tubos en tapón colocar de izq. A derecha ocupar siempre la posición 12 para ajustar la tapa.
Llevar muestras al equipo Fluoro-Software
Al terminar se ADNoteca (Conservación en almacen de ADN de muestras)
Encender Fourocycler (luz verde)
Abrir Software del Fluorotype IVD
Introducir clave (instrucciones equipo)

Primer-1

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos



Fragmento



Test principle of FluoroType® CT



- (Leer) Normas de funcionamiento y organización de los TEL en estas areas de trabajo. (plantilla de trabajo, procesamiento de muestras y control, localización de materiales y reactivos, procedimiento para obtencion de hojas

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

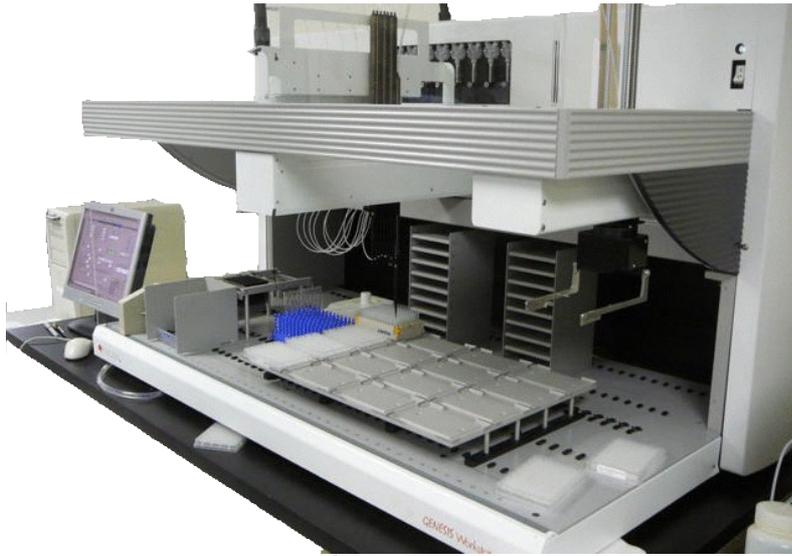
	<p>de trabajo, recuperación de muestras. Orden y atemperado, programación de equipos, preparación de reactivos, colocación de consumibles y cassetes de reactivos en los equipos, comprobación de nivel de residuos, comprobación de solución de lavado, mantenimiento de equipos según instrucciones del manual, registro de mantenimiento en carpetas. Preparación de Racks de muestras, descongelacion de las mismas y atemperado de reactivos, orden de procesamiento Muestras-control en caso de equipos con extraccion de DNA-amplificación y detección observar tubos de salida Ouput como DNA procesado y de entrada IMPUT)</p> <p>Revisión de hojas de actividades por la facultativo Matilde Trigo</p> <p>Apuntes HCV Genotype 2.0 . principio de ensayo (hibridación inversa) Ver</p>
2-5-16	<p>SECCION BIOLOGIA MOLECULAR (Nota: QS se le denomina al control Estándar) La proteincinasa rompe ADN En ADN hemos de tener en cuenta que las fases son lisis, hibridación, `purificación y concentración. aprox. A 60° se produce lisis a 37° los lavados</p> <p>HVC genotype 2.0 Principio de ensayo que utiliza hibridación inversa, el producto DNA de PCR biotinilado generado por la amplificación de RT-PCR de las regiones 5' UTR y core del RNA del VHC ase hibrida en sondas de oligonucleotidos inmovilizados. Las sondas que estan adheridas a una tira de nitrocelulosa por una cola de poly(dT) son específicas de las regiones 5' UTR y core de diferentes genotipos de VHC. Despues del paso de hibridación se lava el rproducto de PCR sin hibridar de la tira y se une a Estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina (conjugado) al híbrido biotinilado. El cromógeno BCIP/NBT o sustrato reacciona con el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina para formar un precipitado de color morado/marrón que produce un patrón de bandas visible en tiras. Ver line Probe Assay (LIPA)</p> <p>Procesamiento) Preparacion del equipo con consumibles Preparación de muestras. Decantar los sueros (650 a 660 µl) bajo campana a tubos limpios que sigan el orden de la hoja de trabajo, los originales se dejan en gradilla en el orden en que fueron cargados.</p> <p>MUESTRA: BAL a la búsqueda de Influenziae A/B VRS (gripes)</p>

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>Extracción de ADN en equipo Magna Pure Tecnica de Izasa Equipo SMARTH CYCLER</p> <p>Muestra: frotis vaginal uretral: investigacion de N.gonorrae Equipo Fluorocyler (Ver)</p> <p>Procesar ENNEVA (enterovirus, herpes virus y virus zoste varicela) muestra: L.C.R. Procesar muestra nasofaringea para GRIPE</p>
3-5-16	<p>SECCIÓN DE SEROLOGÍA (Dra. Matilde Trigo) Equipo quimioluminiscencia para determinar IgG e IgM de Neumoniae, MUMPS (paperas) MEASLES (sarampión) N. pneumoniae legionella en VIRCLIA</p>  <p>QUIMIOLUMINISCENCIA Partículas recubiertas de Ag. que captura anticuerpos presentes en muestra a valorar tras lavados se añade al conjugado compuesto por anticuerpos monoclonales marcados con un derivado isoluminol y lavados posteriores eliminan el conjugado no unido con lo que al añadir reactivo de Starter se produce reacción colorimétrica medida en el sistema óptico).</p> <p>Método semiautomático de ELISA en GENESIS RMP 150 “ANTIGENO DE GALACTAMANANO” (aspergillus) preparación de la muestra en campana (300 µl +100 de EDTA) el calor desintegra complejos inmunes y precipita proteínas que interfieran en la prueba. Método ELISA(anticuerpos monoclonales anti-galactamanano marcados con POX semiautomatizado (ver instrucciones, principio y desarrollo técnico) los lavados eliminan el conjugado no unido (efecto prozona).</p>



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos



RESUMEN Y EXPLICACIÓN Las infecciones por *Aspergillus* aparecen habitualmente después de inhalar las esporas de *Aspergillus* que se encuentran en el medio ambiente. Las formas invasivas, que han ido en aumento en los últimos 10 años, constituyen las infecciones más graves. Aparecen principalmente en pacientes neutropénicos (después del tratamiento anticanceroso) y en pacientes tratados con inmunosupresores (trasplantados de órganos, en particular tras el trasplante de médula ósea) y corticosteroides 7 . Los *Aspergillus* raramente se aíslan en los hemocultivos. El diagnóstico se basa a menudo en signos diagnósticos o radiológicos inespecíficos (síntomas clínicos, TC, radiografía de tórax, etc.) En este momento, la determinación del antígeno soluble galactomanano en suero se considera un método serológico que facilita el diagnóstico de la aspergilosis invasiva 6, 9, 14, 34, 39. 4-

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO 27 Platelia™ *Aspergillus* EIA es una determinación inmunoenzimática en sándwich en microplacas de un solo paso que detecta galactomanano en suero humano. En el método se utilizan anticuerpos monoclonales EBA-2 de rata, que se dirigen contra el galactomanano de *Aspergillus* y se han identificado en estudios previos 16, 28. Se usan anticuerpos monoclonales (1) para recubrir los pocillos de la microplaca y unirse al antígeno y (2) para detectar el antígeno unido a la microplaca sensibilizada (reactivo conjugado: anticuerpos monoclonales ligados a peroxidasa). Las muestras de suero se tratan con calor en presencia de EDTA para disociar los complejos inmunes y precipitar las proteínas de suero que podrían interferir con la prueba 15. Las muestras de suero tratadas y el conjugado se añaden a los pocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales y se incuban. Se formará un complejo anticuerpo monoclonal-galactomanano-anticuerpo monoclonal/peroxidasa en presencia del antígeno galactomanano. Se lavan las tiras para eliminar el material que no haya reaccionado. A continuación, se añade la solución del sustrato, que reaccionará con los complejos ligados al pocillo para dar una reacción de color azul. La adición de ácido detiene la reacción enzimática y cambia el color azul por amarillo. La absorbancia (densidad óptica) de las muestras y controles se determina con un espectrofotómetro configurado con una longitud de onda de 450 y 620 nm.

5-5-16

SECCION DE BIOLOGIA MOLECULAR

C.M.V. en muestra de biopsia.

**Carga viral (VIH) en cabina de seguridad con activación de rayos UV
H1N1 Gripe subtipo (ver apuntes)**

**Extracción de ADN (muestra rinofaríngeo) en EQUIPO MAGNA
PURE**

**Amplificación en ROCHE Lightcycler en capilar, última posición
control negativo. (CP) y detección a tiempo real**

Preparación de muestras con ADN congelado para aplicar técnica de

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>amplificacion y detección de Gonococo</p> <p>LIGHTCYCLER 2.0</p> 
6-5-16	<p>BIOLOGIA MOLECULAR SECCION DE SEROLOGIA. Observacion técnica participante Procesamiento de tecnicas de determinacion: HIDATIDOSE FUMOZE: Basado en principio de hemaglutinacion indirecta. Los hematies-reactivo de ovino estan recubiertos por antigenos Echinococcus granulosus (Quiste hidatídico) La presencia de anticuerpos específicos anti-echinococcus granulosus en suero-problema entraña una aglutinacion de hematies sensibilizados que se traduce en velo rojo /marrón que tapiza la cúpula. En ausencia de anticuerpos específicos estos hematies sedimentan en el fondo de la cúpula bajo forma de anillo. Los hematies no sensibilizados aseguran la especificidad de la reacción y permiten eliminar las interferencias debidas a aglutininas naturales anti-ovino (heteroanticuerpos de forssman, anticuerpos de la MNI...) la reacción se efecta en <u>microplaca</u> con fondo en U Los resultados se obtienen al cabo de una hora. Ausencia de hemaglutinacion es Negativo y la presencia de la misma es positivo.</p> <p>TECNICA HIDATIDOSE FUMOZE:</p> <ul style="list-style-type: none">- Preparar dilución madre <u>de muestras y controles</u> a 1/40 (25 µl + 975 µl) a partir de esta establecer una seriada al 1/80, 1/160/ 1/320 solo en caso positivo se sigue diluyendo (mantener la madre) al 1/640, 1/1280 y 1/2560Utilizar micropipeta de 50 µl para pipetear la serie con Buffer mezclando y - pasando desechar los 50 µl al final de la serie y añadir a todos ellos R1 o lo que - es lo mismo hematies sensibilizados.- Preparar en pocillos. Control tampon, control reactivo, control



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>positivo y control negativo.</p> <ul style="list-style-type: none">- Homogeneizar con ayuda de pipeta (No violentar en vortex)- Guardar en oscuridad 2 horas. Leer. <p><u>TPHA</u> Ver fundamento técnico es test treponémico) Determinacion a muestras... En dilucion madre 1/20 (10 µl + 190 µl muestras y controles) de esta dilucion extraer a tarjeta 25 µl de problema y añadir 75 µl de células sensibilizadas repetir realizando controles con las mismas mediciones (control tampón, control reactivo, control + y control -) Homogeneizar y 1 hora en oscuridad</p> <p><u>RPR (cromatest)</u> Test no treponemico Diluciones ½ ¼ 1/8 1/16 de suero problema y controles Utilizar la pipeta de 50 µl Homogeneizar y 8 minutos en agitación plana de tarjeta. Leer.</p> <p><u>Procesamiento de dos cargas de muestras en equipo Virclia</u> (deteccion de anticuerpos IgM e IgG para sarampion, rubeola, Paperas... Quimioluminiscencia</p>
Día 9-5-16	<p>BIOLOGIA MOLECULAR: BIOSEGURIDAD 3 SECCION DE MICOBACTERIAS (Dra. Pallarés) En esta sección se realizan estudios de micobacterias, las muestras son consideradas potencialmente infecciosas de transmisión aérea. Por esta circunstancia el laboratorio requiere de dotación especial de seguridad</p> <p>Acceso controlado: Diseñado con espacios de zonas de transito hasta el lugar de trabajo: 1º espacio Microscopio óptico (gram y Ziehl) y recepcion de muestras Todas las muestras que solicitan estudio de micobacterias entre otros son transportadas directamente a esta seccion como primera estación receptora, a partir de aquí son distribuidas a secciones que han de compartir la muestra a estudio.</p> <p>2º Espacio: habitáculo para vestimenta apropiada de bata y mascarilla y antisépticos para manos, dotado de presión negativa que controla entrada y salida de ambiente aéreo da paso a 3º espacio o SECCION DE MICOBACTERIAS En ella se distingue 4 zonas diferenciadas de trabajo: <u>Zona de preparación de muestras</u> Las muestras son recepcionadas y registro de incidencias si no cumple requisitos para su procesamiento.</p> <p>2 campanas de flujo laminar (limpia con lejia 10%), Guantes, bata, mascarilla... que permitan la distancia técnica adecuada de la muestra en condiciones seguras para el personal técnico adscrito a esta sección. Centrífuga Frigorífico: Conserva muestras originales o preparadas en tutela por varios</p>

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

días. Obligando a un orden a veces imposible, debido a que se hace pequeña para la cantidad de muestras que deben ser conservadas)

En esta zona en U tiene en un lateral un mostrador para proceso final de muestra donde se realiza test de inmunocromatografía SD TB Ag MPT 64 para discriminar M. TB de otras micobacterias. Y pequeño almacenaje material de uso.

Zona de inicio de procesamiento pruebas adicionales o preparación de las muestras con estudio compartido con bacteriología

Mostrador con puentes para tinciones manual (Zhielh y Auramina) y automático (Equipo **PREVI COLOR GRAM BIOMERIEUX**)

Zona intermedia

Para acoger las muestras ya preparadas y sembradas con estufas convencionales (para cultivo y crecimiento de medios sólidos en placa o tubo) y sistema **BACTEC MGIT 960 para crecimiento en medio**

líquido y antibiogramas

Zona de Archivos de carpetas y equipos informáticos y control de todo el sistema : localización de muestras en sistema informático, preparación de hojas de trabajo diario, carpetas de archivo, consultas técnicas, Validaciones de datos, registro informático, lecturas de resultados...

En esta zona se dan lectura y observación visual física de tubos de medio que el BACTEC 960 descarga como negativos o positivos y los que son **antibióticos o SIRE** contrastándola con datos aportados por el sistema BACTEC 960. Anotaciones en las hojas-paciente.

PROCESAMIENTO:

Desde la recepción de muestra:

Diferenciamos 2 grandes grupos de muestras sobre las que se inicia un procesamiento distinto

GRUPO 1- Muestras biológicas con conducto natural de salida, su recogida en en recipiente estéril, no requiere técnica invasiva, sigue normas adecuadas y colaboración-voluntariedad de paciente. (Ver condiciones de volumen y recogida)

En este grupo: esputos, orinas (3 muestras 40 ml. 3 días consecutivos), heces (3 muestras/3 días de 1 g)... la más frecuente es la de ESPUTOS

GRUPO 2 Muestras biológicas sin conducto natural de salida que requiere técnica invasiva de extracción por personal sanitario experto en condiciones estrictas de esterilidad.

En este grupo se consideran los líquidos o muestras estériles:

adenopatías, L.C.R. líquido pleural, ascítico, articular, peritoneal, pericárdico M.O, **sangre** (si en hemocultivo esta será la muestra original, si ha de ser transportada antes de cultivo anticoagular con heparina o en tubo Isolator) Biopsias, bazo o hígado, PAAF (punción de aspiración final), cateter telescopado ...

Tras la recogida en contenedores o recipientes estériles deben ser enviados rápidamente al laboratorio de microbiología sección de micobacterias y su procesamiento debe ser inmediato para evitar

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

sobrecrecimiento de flora microbiótica acompañante.

A todas las muestras pretratadas o no:

- extensión para **tinción (auramina)** / excepto orina (tinción de Zielh-Neelsen)
- extendido para **tinción de gram** y
- **siembra en placa estas dos últimas si la muestra ha de ser compartida con bacteriología, parasitología o micología.**

Las muestras se transfieren a tubos azules cónicos (grandes 50 ml.) etiquetados en campana de seguridad N9

Aquellas muestras que se le solicita PCR separar muestra original en tubo de muestra de 2 ml.

Las muestras de GRUPO- 1 precisan pretratamiento basado en Homogeneización/Descontaminación/ Concentración (x centrifugado)

Las muestras GRUPO2 Homogeneizar sin descontaminar concentrar y sembrar

La mayor parte de las muestras clínicas **GRUPO 1** están contaminadas con una **flora bacteriana mixta** que tiene un poder de multiplicación más rápido que las micobacterias, por esta razón requieren ser preparadas aplicando **un procedimiento de descontaminación** capaz de eliminar en la medida de lo posible los contaminantes sin que afecten a la viabilidad de las micobacterias. El método de descontaminación utilizado (Kubica y Cols) combina **hidróxido sódico (Agente descontaminante) con la N-acetil-L-cisteína (agente mucolítico) compatible este pretratamiento con medios de cultivo habituales (VER TÉCNICA DE DESCONTAMINACION)**

A continuación sembrar **(VER TÉCNICA DE SIEMBRA)**

La siembra se realiza en tubo Coletos (medio Lowenstein) y **MGIT (Mycobacterial Growth Indicador Tube)** este último tubo se introduce en el sistema

BACTEC MGIT 960



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos



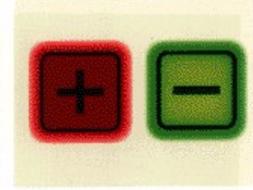
Step 1: Select workflow



Step 2: Scan tube at instrument



Step 3: Load where indicated by green LED



Step 4: Remove positives and completed negatives as they occur



El tubo MGIT medio fluorométrico basado en un 7H9 de Middelbrook con un componente fluorescente (pentahidrato de rutenio) embebido en silicón. Bajo luz ultravioleta el crecimiento se aprecia mediante visualización de un brillo fluorescente anaranjado en la superficie y fondo de tubo como consecuencia de consumo de O₂. Los resultados se proporcionan como positivo o negativo. Este tubo incorpora un antibiótico que inhibe flora y favorece el crecimiento de micobacterias. Este sistema controla los tubos continuamente cada 60 minutos para detectar un aumento de fluorescencia. Cada tubo que el instrumento detecta como positivo contiene aprox. 10⁵ a 10⁶ de unidades de colonias por ml. (UFC/ml. los frascos que permanecen negativos durante un mínimo de 42 días hasta 56) y que no muestran indicios de ser positivos se retiran del instrumento como negativos. La luz roja del sistema indica los positivos. *Las siembras en medio sólido (coletsos...) se ponen en estufa a 37°*

(Ver protocolo de funcionamiento de este equipo)

Ver procedimientos y protocolos de siembra en tubos y en placa en apuntes.

Se procesan diariamente Muestras de respiratorio

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

(Para S.B o secreción bronquial: A.S. MacKonkey y agar chocolate..)

En cada una de las manipulaciones, la retirada de materiales usados se harán según protocolos adscritos en esta sección para cada una de las operaciones técnicas.

Procedimiento para muestra de hemocultivo (30 ml. en tubo azul de muestra del medio Ver como sigue en apuntes.)

Se realizan TINCIONES DE AURAMINA . (ver Técnica en apuntes 15-3-3)

Observacion de Bacilo de Koch en microscopio fluorescente.

Las tinciones de gram en equipo PREVI COLOR GRAM BIOMERIEUX.



10-5-16

SECCION BIOLOGIA MOLECULAR Bioseguridad-3

A primera hora de la mañana los TEL sacan los listados de trabajo.

Comprueban las muestras positivas de incubador BACTEC MGIT 960 y todas estas muestras ha de realizarse un pase de siembra a Agar Sangre y una tinción de Ziehl donde se comprueba si el crecimiento es de micobacteria.

Todas las muestras positivas de Bactec MGIT 960 se les dá un pase a agar sangre y se realiza una tincion de Ziehl.

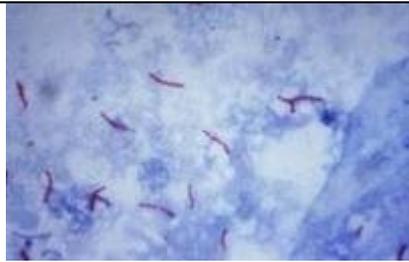
TINCION DE ZIEHL: sigue técnica de 8' fucsina fenicada con aplicación de calor en este paso para favorecer la entrada del colorante en bacilo de Koch . 2' de decoloración con alcohol clorhídrico lavar y 2' de azul de metileno.

Reactivos QCA Fucsina fenicada ref. 999910 decolorante Referencia 99208 (QCA)

Observación de Tinción positiva:



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos



Recepción de Líquido pleural para estudio de micobacterias: procesamiento siempre en campana de flujo.

Esta muestra pertenece al grupo 2 (líquidos estériles) por lo que no se descontamina. Se centrifuga 15' a 3000 rpm. Decantar sobrenadante, Homogeneizar sedimento, realizar extensiones para **tinción de Auramina** y resto de sedimento se procesa en tubo cónico de tapa azul.

Técnica de Auramina (15-3-3) Ver apuntes.

Resto de muestras grupo 1 : Homogeneización, descontaminación, concentración siembra en medio líquido y sólido según petición y protocolo. Final de cada proceso limpieza con lejado de campana. No se tendrán en la misma más de 16 muestras y las que se saben positivas se procesarán al final.

Las muestras sembradas en medio líquido. Se introducen en sistema Bactec MGIT 960 siguiendo instrucciones de equipo para entrada de tubos. Estos tubos no se retirarán a menos que sean positivos. A diario se comprueba (Hoy 7) y a los positivos se les da un pase a agar sangre y tinción de Ziehl. Recepción de muestra de aspirado Bronquial (BAS) con estudio compartido para bacteriología y Mycobacterias. Se recibe primero en esta sección y desde aquí se procesa para Mycobacterias 1º y se prepara siembras en Agar chocolate recuento y aislamiento agar sangre, en Mach para aislamiento, si piden hongos en placa de hongos (Genta+cloranfenicol) siembra para recuento, hacer TÉCNICA DE TINCION DE GRAM de muestra primaria TÉCNICA DE TINCION AURAMINA para envío de muestra iniciado el procesado y seguir su estudio a la par en bacteriología. Conservar muestra original. Ver Técnicas y protocolos en apuntes.

SECRECIÓN BRONQUIAL siembra en A. Chocolate (técnica de 4 cuadrantes y Cº de asa) A. Sangre, A. Mack. Muestra original en porta para Gram.

Guardar la muestra original para mycobacterias.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE HEMOCULTIVOS

Transferir de hemo 30 ml. A tubo cónico azul Centrifugar 15 minutos desechar 20 ml. Y dejar 10 ml. De sedimento: tinción de auramina.

Después sembrado en medio líquido y sólido de sistema MGITE (es necesario tener siempre en cuenta retirar para PCR 1 ml. en aquellas muestras que soliciten este estudio)

Aquellos hemocultivos que envían de Bacteriología con mucha flora

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>precisa aplicar técnica de descontaminacion MUESTRAS DE ORINA Dejar sedimentar toda la noche en nevera. Al día siguiente Descontaminar y realizar Zielh y guardar muestra si petición PCR. Ver apuntes.</p>
Dia 12-5/16	<p>Procesamiento de muestras preparadas del día anterior. Entre ellas líquido articular. Recepción de nuevas muestras. EXTRACCION ADN para PCR 1.- Descongelación de muestras para realización de PCR y extracción de ADN estas son muestras descontaminadas y conservadas en congelador hasta que son procesadas para este análisis. Esta técnica se realiza 2 días por semana. Se localizan las muestras por orden de petición en los estuches de congelación. Se cogen el nº de muestras adaptándose a la capacidad del equipo (12 Fluorolyser o lo que es lo mismo 11+control) identificar muestras en el sistema. Preparación de las muestras para Extracción de ADN en campana de flujo laminar poniendo nuevos tubos de rosca de 3 ml. Estériles cónicos, puntas de pipeta y pipetas de 500 microlitros. De la muestra original :500 microlitros. Centrifugar y quedar con sedimento Añadir 100 microlitros de LYS (lisado con F-Lys) Ver técnica Fluorotipe MTB Preparacion de control interno(IC FTMTB : 100 microlitros de tampon Lys +2 microlitros de ADN control interno. Para la muestra 500 microlitros de muestra descontaminada centrifugar 15' a 10.000 eliminar sobrenadante y al sedimento añadir 100 microlitros de F-Lys Extracción por técnica manual de ADN de muestra clínica con Kit Fluorolyse. Principio: 1- Precipitación de células en muestra líquida 2.- lisis en condiciones alcalinas y elevada temperatura 3.- Neutralización 4.- DNA genómico que puede sisarse o congelar a -20° C Técnica manual Baño de agua (tapa cerrada) 5' a 95° Centrifugar brevemente Añadir 100 microlitros de tampon de neutralización (F-NB) y vortear Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad= Solución de ADN Tecnica de PCR en Fluorolyse: Desnaturalización de ADN KIT de reactivos: Reactivo A contiene tampón primers específicos para bacilo</p>

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

tuberculosisAM- AFT-MTB sondas marcads con fluorocromos Nucleotidos Taq polimerasa.

Reactivo B Mezcla de amplificación Tampon y sales.

Amplificacion-Deteccion:

No utilizar vortex mezclar con cuidado

Por cada muestra 3 microlitros AM-A , 7 microlitros de AM-B (solucion de Master-Mix o mezcla de A+B) y 6 microlitros de solución de ADN volumen total 16 microlitros en cada tubo-problema.

Los tubos son etiquetados solo en la mitad superior para facilitar lectura en aparato por fluorescencia.

Al final se pone el control.

El resto de ADN se congela en Adenoteca.

Evaluacion e interpretacion (V. pags 4-5 de Fluorotype MTB)

El DNA de complejo MTB tiene una temperatura de melting TM de 71°C y el control interno 59,5°C el algoritmo aplicado causa variaciones en la altura de los pics, Estas variaciones no permiten elaborar conclusiones sobre n° de moléculas diana en la muestra y no tienen relevancia.

La temperatura de melting puede desviar +/- 3° del valor indicado

Los picos específicos del complejo MTB son considerados+ por el fluor-software IVD Picos muy bajos dentro de la zona umbral definida, son considerados negativos para muestras de control positivo/ negativo.

Ver técnica Mycobacterias PCR

El ensayo Fluorotype MTB de deteccion de MTB familia mycobacteriaceae incluye especies M. tuberculosis .

La sondas utilizadas con **fluoroforos especificos** forman cadena simple emision fluorescente baja, debido a propiedades inhibitoras DNA (bases contiguas) Durante hibridacion de sondas a DNA diana los fluoroforos se retiran de las proximidades de la sonda y la señal de fluorescencia puede ser emitida

Tras la amplificación e hibridación los fluoroforos de sonda son excitados por los LEDS del Fluorocycler y la señal de fluorescencia emitida, es medida incrementando gradualmente las condiciones de temperatura. La secuencia nucleotida de las sondas es complementaria de una secuencia específica del complejo MTB. Si está presente DNA del complejo MTB en concentración detectable se mide una T^a de melting específica durante el analisis de curva melting. Aplicando la primera derivada matematica se produce un pico caracteristico a una cierta temperatura de melting.

Kits de reactivos peligrosos protección adecuada.

Recepcion de nueva muestra:

Procesamiento de liquido seminal (Muestra grupo 1) tincion de auramina, gram y siembra en placa proceso de preparación.

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>TINCION DE AURAMINA Ver técnica 15-3-3) <u>Observación a microscopio fluorescente de baciloscopia positiva</u>, distinguir de artefactos, tinción de amarillo fluorescente de los bacilos medio curvados a modo de coma. Al mover micrométrico se observa irisación de los bacilos.</p>  <p>En tincion fluorescente ha de usarse agua destilada estéril. Si la muestra es esputo extender con torunda estéril en porta. Tecnica: Preparar frotis. Fijar con calor. Poner en gradilla de tinción. Cubrir con Auramina-rodamina 15'. Decolorar (MT) 3'. Lavar con agua destilada. Aplicar permanganato potásico 3' Lavar con agua destilada estéril. Reactivos: colorante auramina ref. 993842 (QCA) Permanganato potásico Ref. 994360 y decolorante MT (QCA) ref. 996830 Laboratorios Química Clínica Aplicada (QCA)</p>
13-5-16	<p>A primera hora: organización del trabajo. Hojas de muestras Muestras para procesar iniciadas ayer y muestras de primera hora (CAMPANA) A las muestras se retira para auramina o siembra en placa en estudio compartido</p> <p>DESCONTAMINACION Resto de muestra en tubo azul conico al que se añade hasta la marca 10 de agua destilada estéril Añadir hasta la marca 20 de reactivo A preparado (descontaminante NaOH + N-acetil cisteína como agente mucolítico. Vortear. Esperar 15' Añadir hasta la marca 50 ml. de reactivo B o solución tampón: siempre debe tenerse cierta cantidad de tampón en frasco estéril. Mezclar y centrifugar 15' sin reposar en este paso. Decantar desechando sobrenadante con cuidado de no eliminar pellet o sedimento de muestra. Los desechos en campana de flujo y en frasco adecuado con lejía. Añadir al sedimento 2 ml. de Tampon y resuspender: MUESTRA</p>

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

PREPARADA Y DESCONTAMINADA

Esquema de organización de trabajo.

Posicionar muestras por orden y número en gradilla de muestras para tubos azules.

Posicionar los tubos de siembra en el mismo orden de listado que muestras en la gradilla

adecuada según peticiones (medio líquido y sólido, solo medio sólido...)

Tener en cuenta las peticiones de PCR y preparar tubos para contener la muestra (1 ml.)

Separarla de la muestra descontaminada.

SIEMBRA

En tubo de medio sólido o COLETSOS 2 o 3 gotas de muestra

El medio en tubo líquido (MGIT 7 ml. añadir 800 microlitros del preparado: Ver apuntes)

en el tubo preparado añadir 500 microlitros de muestra

(NOTA: las muestras de BAL Y BAS con estudio compartido para bacteriología se diluyen según protocolo a diferencia de las que se preparan para micobacterias que se concentran)

Muestras de hoy: esputos, orinas, líquido seminal, L.C.R.

Observacion de crecimiento positivo de MTB en medio de coletsos:

Colonia a modo de miga de pan blanca. (42 días a 52 días)

Hoy:

RESULTADOS DE SALIDA

Se retiran del BACTEC MGIT 960 Todos los tubos muestra que han cumplido el tiempo total de incubación: 52 días si estos son Negativos salen antes que los medios de Coletsos (medio sólido en estufa a 37°)

Se opera la retirada anotando en el sistema los resultados negativos y en su hoja de petición correspondiente.

Se comprueban las mismas muestras en medio sólido de cultivo en estufa y se retiran los negativos. Puede darse el caso que en medio sólido sea negativo y en medio líquido + o a la inversa.

A las muestras de resultado negativo se les prepara para un Zielh de salida (confirmación de resultado)

Nota: si uno de los medios es negativo y el otro se ha contaminado se dá como negativo.

Los tubos de Coletsos que presentan un color verde³ mas intenso suelen ser variaciones de Ph.

Se anota el resultado en ordenador interno y obtienen la validación final por el facultativo que vierte los datos-resultados al sistema externo.

No obstante los tubos pese a resultados de Bactec 960 se comprueban visualmente el tipo de crecimiento (facultativo)

La retirada final de tubo en contenedor negro de residuos infecciosos.

Hoy salen 2 positivos en BACTEC MGIT 960

Hemos de discernir visualmente y por confirmación test si son positivos de

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

MTB o contaminación. Para lo cual:

- 1.- Sembrar en campana en placa de Agar sangre (cultivo máximo 72 h.)
- 2.- Realizar un Ziehl: preparación en porta de un extendido dispensando en el porta rotulado a lápiz el nº de muestra 1 gota de pool de suero de gestantes y añadir encima 0,2 ml. +/- de fondo del tubo MGIT de medio líquido positivo.

Es necesario comprobar siempre el aspecto del tubo de medio líquido si existe presencia de crecimiento escamoso posible micobacteria TB a pesar de que la placa de agar sangre fuese negativa.

En esta confirmación final se ordena una sonda:

TEST INMUNOCROMATOGRAFIA SD TB Ag MPT64



Test rápido casa comercial Estándar Diagnostic

Principio:

Tiene una finalidad de discriminar MTB de otras micobacterias. Es una prueba rápida de identificación inmunocromatográfica que usa Anti MPT 64 monoclonal de ratón a partir de muestra de cultivo en medio líquido. Consta de un cartucho de una almohadilla para la muestra, una almohadilla para el conjugado dorado, una membrana de nitrocelulosa y una almohadilla absorbente.

Los antiMPT 64 monoclonal fueron inmovilizados sobre membrana de nitrocelulosa como material de captura en prueba.

Otros anticuerpos que reconocen Ag (epitopes de antígeno MPT64 y conjugados con partículas del coloide dorado fueron usados para captura del antígeno y la detección en un ensayo tipo sandwich.

El dispositivo de prueba rápida SO Bioline Ag MPT 64 tiene una letra C o línea de control

Letra I o línea de prueba

Ambas sobre superficie de cassette.

Ambas líneas control y línea de prueba no son visibles en la ventana de resultado antes de la aplicación de cualquier muestra.

Línea control: control del procedimiento siempre aparece si ha sido realizada la prueba correctamente y el reactivo-s funcionan.

Al ser aplicada la muestra esta fluye lateralmente a través de la membrana, el anticuerpo conjugado (colide dorado) se une a antígeno MPT64 de muestra en medio líquido.

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>El complejo continua fluyendo y se une al anti MPT 64 monoclonal de raton en fase sólida en la línea de prueba.</p> <p>RESULTADOS Produciendo banda de color rojo púrpura (POSITIVO) NEGATIVO: no hay línea en la región de banda de la prueba= ausencia de MPT64</p> <p>El Kit contiene 25 dispositivos de prueba en bolsa aluminio con desecante. Buffer de extracción para preparación de muestras a partir de cultivo sólido Instrucciones de uso Ingredientes activos de principales componentes Tiras de prueba coloides dorado anti MPT64 monoclonal de ratón conjugado dorado 0,24 +/- 0,048 microgramos línea de prueba anti- MPT 64 monoclonal de ratón 0,32+/- 0,064 microgramos, línea control Ig antiratón de cabra (0,64+/- 0,128 microgramos. Diluyente de ensayo Buffer fosfato 100 mM (0,5 ázida de sodio). Ver técnica en apuntes</p>
16-5-2016	<p>Muestras. Recepcion y tecnica de preparacion de las mismas Hoy Antibiogramas de crecimiento cultivo liquido positivo: SIRE (Estrepto-Isoniazida-Rifampicina-Etambutol) Ver técnica de preparacion de inculo (1/5 AST de 3 a 5 dias) en suero salino 5 tubos MGIT por muestra uno de ellos para control Introducir tubos preparados en gradilla de transporte identificar e incorporar a sistema bactec MGIT 960.</p>  <p>Sacar los fármacos liofilizados en caja SIRE y reconstituir con 4 ml. de agua destilada estéril. 5 tubos MGIT medio líquido por muestra. 4 antibioticos y 1 control. (es el mismo tubo que se utiliza para siembra). Reconstituir con 0,8 ml. suplemento SIRE para crecimiento Añadir 100 microlitros de cada droga a los tubos etiquetados previamente. Preparar Inculo de crecimiento dilución 1.100 Inocular el tubo control de crecimiento con 500 microlitros de la dilución 1/100</p>

ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

	<p>Inocular con 500 microlitros de la suspensión de microorganismo el resto de los tubos que contienen los fármacos Colocar los tubos en la gradilla de transporte y posicionar en el BACTEC 960 en el cajon de antibiogramas. Observación de antibiogramas y curvas de crecimiento control</p> <p>TINCION DE GRAM Observacion de TINCION DE AURAMINAS: contrastando en la observación las positivas y las negativas para retener las imágenes en la retina.</p>
<p>19-5-2016</p>	<p>Observacion de tinciones de Ziehl + diferenciamos bacilo de Koch (TB) de otras micobacterias por disposición de los grupos de bacilo en cordones teñidos a la fucsina. Observacion de Ziehl positivos: aspecto típico</p> <div data-bbox="331 763 935 987" data-label="Image"> </div> <p>REALIZACION DE PCR Descongelar muestras:6 PCR de crecimineto en medio liquido MGIT: 5 muestras PCR en FLUOROTYPE 1.- EXTRACCION DE DNA Encender campana Poner tubos limpios Poner las muestras 500 microlitros de muestra en cada tubo correspondiente Centrifugar 15 ‘ a 10.000 g (160g= 1500 rpm) Al sedimento añadir 100 microlitros de mezcla realizada en otro tubo para 12 muestras (1200 microlitros de lys y 24 microlitros de control interno) 5’ a 95°C en TWIN INCUBATOR DG 210 (calor ceco (tapado) Añadir 100 microlitros de neutralizante a cada muestra. Vortear 5” Centrifugar en SIGMA 1-14 a maxima velocidad (16.100 g) 5 minutos = DNA en muestras</p> <p>2.- Pasar a laboratorio de biologia molecular 2 y bajo campana preparar tubos para Amplificacion y deteccion (PCR) en Fluorotype . VER TÉCNICA</p>
<p>20-5 16</p>	<p>Preparacion de Antibioticos para SIRE Los viernes</p> <ul style="list-style-type: none"> - se preparan los reactivos antibioticos de trabajo y se cambian los números de lotes en control.(antibiograma para Micobacterias bacilo tuberculosis)



ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira Santos

- **Congelación** en partes alicuotas de 120 µl puesto que e precisan 100 para su uso.

Se reconstituye según indicaciones (4 ml agua destilada estéril para todos menos para Estreptomicina con 2ml.) de cada uno de ellos. La presentación es liofilizada

- **Retirada de muestras de nevera** a las que se hayan realizado todas las determinaiones solicitadas y tengan mas de 5 dias guardadas/custodiadas en nevera.
- Se comprueba a fin de semana **Los Ziehl de salida** de muestras negativas.
- Se localizan las **muestras de negativos en estufa**.
- Los medios sólidos se observan y comprueban visualmente el tipo de crecimiento para validación y anotación en hoja de identificación de paciente y muestra con el resto de resultados. Semanalmente se comprueban y se pasan a la estufa de positivos si se avisa en bactec de positivo.

ANTIBIOGRAMA SIRE

Fundamento MGIT BBL

El tubo contiene 7 ml de caldo Middelbrok 7 H9 modificado.

Permite el crecimiento y detección de micobacterias, un compuesto fluorescente incluido en silicona que está en la parte inferior del tubo. El compuestofluorescente es sensible a presencia de O₂ disuelto en caldo la concentracion inicial de O₂ disuelto apaga las emisiones procedentes del compuesto por lo que se detecta poca fluorescencia. Mas tarde los microorganismos al respirar y crecer activamente consumen O₂ lo cual permite la fluorescencia del compuesto.

BACTEC MGIT 960 SIRE es analisis cualitativo de 4 a 13 dias, analisis comparativo de la cepa aislada M tuberculosis en tubo de crecimiento antibiotico para determinar analisis de sensibilidad.

Se detecta resistencia a antibiotico cuando al menos 1% de la poblacion es resistente a concentraciones del antibiotico utilizado en “**concentracion critica**” o concentraciones bajas de antibiótico. Llamamos concentración crítica la concentracion de antibiotico que permite interpretar resultado como resistencia7sensibilidad (Clinical and laboratory Stand Institute o CLSI)



**ACTIVIDADES ESTADÍA FORMATIVA : Ana Carmen Loira
Santos**

Facultativos Tutoras estadía LABORATORIO MICROBIOLOGIA :

Matilde Trigo Daporta

Marta García Campello

M. Angeles Pallarés González

María Victoria Pulián Morais

Sandra Cortizo Vidal

