

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

PNT d'anàlisi microbiològic d'una mostra d'esput al laboratori

Laboratori de *GRYMM Lab Theory*.

Fet per **Gemma Torrodà, Ylenia Vico, Mikel del Valle, Rodrigo Muñoz i Marina Lloses**.
Divendres, 5 de maig del 2019

Aprovat el dijous, 5 de maig de 2019

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

ÍNDEX

1. Objectiu.....	pàgina 3
2. Responsabilitat de l'aplicació.....	pàgina 3
3. Definicions.....	pàgina 3
4. Descripció.....	pàgina 4
5. Registres.....	pàgina 8
5.1. Control de canvis.....	pàgina 9
6. Annexos.....	pàgina 10

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

1. OBJECTIU

L'objectiu d'aquest PNT és poder identificar els possibles patògens en una mostra d'esput.

2. RESPONSABILITAT D'APLICACIÓ

La responsabilitat d'aplicació i l'abast d'aquest procediment recau sobre tot el personal (Tècnic i Auxiliar) que precedeix a la reacció o complementació d'un PNT i dels registres que genera.

3. DEFINICIONS

- **H2O dd:** aigua destil·lada.
- **Nansa:** material de laboratori utilitzat a l'àrea de microbiologia.
- **Agar nutritiu:** els medis d'agar selectius són utilitzats per a aplicar una pressió selectiva als organismes que hi creixen.
- **Erlenmeyer:** és un recipient de vidre que s'utilitza en els laboratoris, té forma de con i té un coll cilíndric, és pla per la base. S'utilitza per escalfar líquids quan hi ha perill de pèrdua per evaporació o com a titular en l'anàlisi quantitativa. (*figura 1 annexe*)
- **Enrasar:** posar a ras, al mateix nivell, al mateix pla.
- **Guants ignífugs:** (*figura 2 annexe*)
- **Flascó:** és un recipient petit de coll ample, generalment de vidre que serveix per contenir líquids. (*figura 3 annexe*)
- **Autoclau:** és un dispositiu que serveix per esterilitzar material mèdic o de laboratori. (*figura 4 annexe*)
- **UFC:** una UFC és una unitat formadora de colònies que és cada un dels punts que hi ha en una placa de Petri sembrada. (*figura 5 annexe*)
- **Placa de Petri:** recipient rodó amb una coberta de la mateixa forma. (*figura 6 annexe*)
- **Cristal Violeta:** colorant per veure bacteris Gram +.
- **Lugol:** solució de iode molecular.
- **Safranina:** colorant biològic.
- **Tinció Gram:** tinció que ajuda a diferenciar ràpidament els bacteris.
- **Bec Bunsen:** instrument per escalfar/esterilitzar. (*figura 7 annexe*)
- **Antibiograma:** és una prova que es realitza en una placa sembrada sense incubar i serveix per detectar la sensibilitat dels bacteris a certs antibiòtics. (*figura 8 annexe*)
- **Inòcul:** conjunt de microorganismos que es desenvolupen en un medi

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

- **Halus d'inhibició:** els halus d'inhibició és la zona al voltant d'un disc d'antibiòtics d'un antibiograma en el qual no es produeix creixement bacterià en una placa d'agar inoculada amb el germen.

4. DESCRIPCIÓ

Recordeu que totes les mostres que arribin al laboratori de Microbiologia sempre es consideren potencialment contaminades.

Quan sospitem d'una infecció de l'aparell respiratori, normalment es sol·licita una prova d'esput per poder analitzar-la i determinar quin és l'agent causal.

El primer pas és la recollida de la mostra, que normalment ja ens arriba al recipient corresponent.

Podem fer primer una tinció de gram per comprovar la qualitat de la mostra i no malgastar recursos fent proves amb una mostra que no compleix els requisits.

● Tinció de Gram

- Encendre el bunsen i preparar la zona de treball.
- Preparar un pont de tinció i una cubeta.
- Preparar tots els reactius necessaris (Cristall violeta, Lugol, Decolorant, Safranina).
- Preparar flascó amb H₂Odd.
- Preparar la placa de petri de la qual obtindrem la mostra bacteriana.
- Preparar portaobjectes.
- Posar el portaobjectes al pont de tinció.
- Afegir una gota d'aigua destil·lada al porta.
- Amb una nansa tocar una colònia aïllada de la placa de petri i barrejar-la amb la gota d'aigua al portaobjectes.
- Fixar la mostra del portaobjectes, calentant-la al bunsen.
- Una vegada fixada la mostra, la cobrim amb cristall violeta i deixem actuar 1' a temperatura ambient.
- Rentem les restes amb H₂Odd.
- Afegim a la mostra 2 - 3 gotes de Lugol i deixem actuar 1' a temperatura ambient.

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

- Rentem les restes amb H₂Odd.
- Rentem la mostra amb decolorant alcohol-acetona fins que el sobrant sigui transparent.
- Afegim a la mostra 2 - 3 gotes de Safranina 1 i deixem actuar 1' a temperatura ambient.
- Rentem les restes amb H₂Odd.
- Deixem assecar la mostra a temperatura ambient.
- Observem el resultat al microscopi.



Figura 9.

Una vegada hem comprovat que la qualitat de la mostra és acceptable, podem continuar fent la sembra i la incubació.

Farem una sembra per esgotament en una placa de petri.

● **Preparar Agar nutritiu i solidificar en placa de petri:**

- 200 ml Agar Nutritiu.
- Per fer els càlculs mirar etiqueta de l'agar.
- Agafar erlenmeyer amb volum necessari i tarar la balança.
- Amb una espàtula neta posar l'Agar a l'erlenmeyer.
- Amb una proveta graduada enrasar 200 ml d'aigua destil·lada i afegir-ho a l'erlenmeyer.
- Posar la mosca magnètica dins de l'erlenmeyer.

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

- Tapar l'erlenmeyer amb paper de plata.
- Agafar un agitador magnètic amb calefacció, col·locar-lo, agitar-lo i pujar la temperatura al màxim.
- Esperar a que bulli.
- Un cop ha bullit, retirar el medi amb guants ignífugs i evocar-lo en un flascó de 250 ml.
- Autoclavar-lo (posant nom i data a la cinta d'autoclau i no tancant-lo del tot) a 121°C i 15 min.
- Un cop autoclavat agafar 10ml en un tub d'assaig estèril i comprovar el pH en condicions estèrils a la cabina de flux laminar. (persona 1)
 - Mesurar el pH: pH metre (etiqueta). Pot variar 0,2 per sobre o per sota.
- Control macrosòpic: anotar color que observem al medi i presència de grumolls o absència
 - Quan està atemperat introduir-lo a les plaques de petri → 2mm de gruix aprox
 - Deixar solidificar i refredar amb la tapa en una superfícies fresca i les plaques separades
 - Retolar per la part de baix, mai per la tapa! → nom i data
 - Ara només queda fer la sembra bacteriana.

Sembra per esgotament:

- Encendre bunsen i preparar la zona de treball.
- Agafar les plaques de petri amb agar nutritiu.
- Rotular les plaques de petri per la base amb les dades i/o etiqueta del pacient.
- Amb una nansa agafem una mostra del recipient amb orina.
- Extenem la mostra per la placa, seguint les indicacions de la imatge.
- Tapem la tapa de petri.
- Ho posem a l'estufa durant 24h a 37°.
- Comprovar si hi ha creixement bacterià.
- Fer recompte de UFC.

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

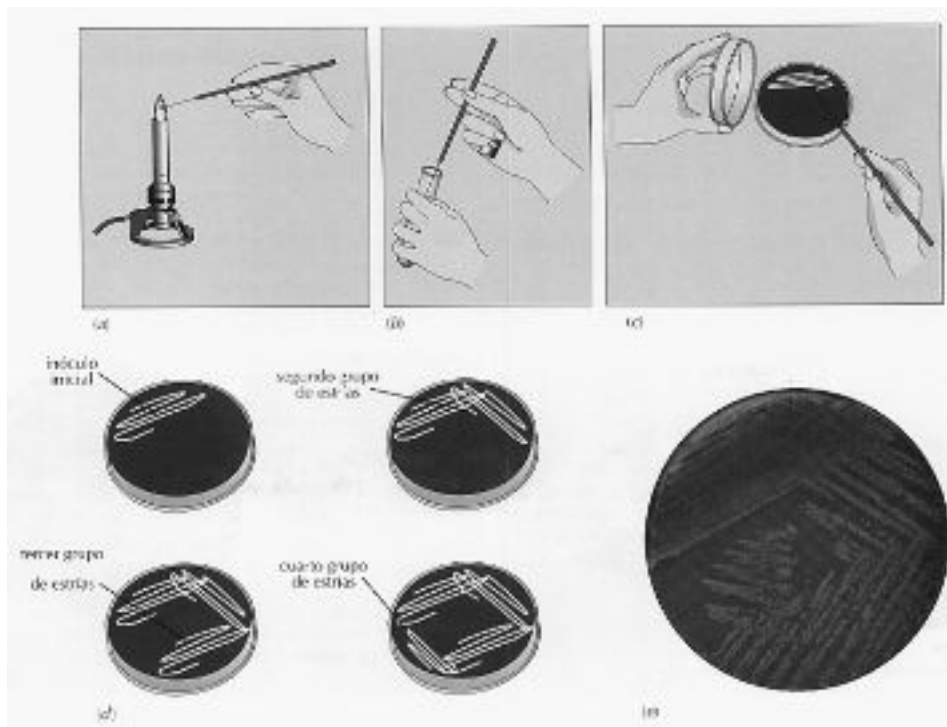


Figura 10.

Per finalitzar realitzarem un antibiograma per poder detectar la sensibilitat que té aquesta bacteria té als antibiòtics.

● **Antibiograma**

L'antibiograma és una prova que es realitza per detectar la sensibilitat dels bacteris a certs antibiòtics.

- Amb la nansa de sembra recollir 2-3 colònies del bacteri que volem estudiar
- Introduir les colònies en un tub d'assaig amb 2 cm³ de sèrum fisiològic
- Agitar suaument fins obtenir una suspensió homogènia
- Agafar una placa de petri amb un medi nutritiu
- Sembrar l'inòcul uniformement sobre el medi
- Carregar els discos que contenen antibiòtics amb l'ajuda d'un aplicador
- Incubar a l'estufa a 37°C durant 24h
- Fer una lectura dels halus d'inhibició

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

4. REGISTRES

Codi de registre	Procés	Fet per	Motiu	Arxivat a
0826783	Descripció	Glòria Estela	Que tothom ho pugui entendre	Carpeta Drive
0826784	Annexos	David Gamito	Taules i imatges prescindibles	Carpeta Drive
0826785	Control de canvis	Laura Gil	Canvis en el procediment	Carpeta Drive
0826786	Definició	Laura Martínez	Posar totes les paraules encara que per nosaltres siguin fàcils	Carpeta Drive
0826787	Registre	Gloria Estela	Canvis del Feedback (exemple)	Carpeta Drive

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

5.1. CONTROL DE CANVIS

El control de canvis es fa periòdicament. Això es divideix en **quatre fases**: la sol·licitud de canvi, l'avaluació i la aprovació/rebuig del mateix i la implantació. Una vegada sol·licitat, s'avalua i s'aprova o es rebutja. Això s'indicarà també en l'apartat de l'estat (Aprovat/Rebutjat). Quan s'aprova, es fa la implantació, i quan ja estigui fet, es posarà "implantat".

GESTIÓ DE CANVIS					
Canvi	Sol·licitant	Firma	Data	Descripció	Estat
Fer més d'una sembra	Gemma Torrodà	Gemma	15/2/18	Per poder assegurar-nos del resultat	Implantat
1mm de sembra	Marina Lloses	Marina	26/7/18	És suficient 1 mm per fer les sembres en comptes de 2 mm	Aprovat
2 plaques de petri	Ylenia Vico	Yle	7/4/19	Dues plaques de Petri per si ens surt malament la sembra	Implantat
3 tubs Falcon	Rodrigo Muñoz	Rodrigo	2/5/19	Tres tubs Falcon per veure les sembres de punció	Aprovat
250 ml d'Agar nutritiu	Mikel del Valle	Mikel	2/5/19	250ml a canvi de 200ml per fer més cultius	Avaluat

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

6. ANNEXOS

- Figura 1:



- Figura 2:



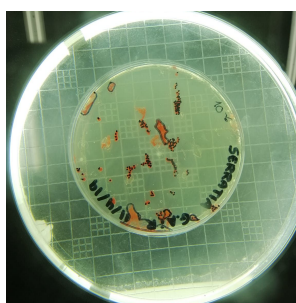
- Figura 3:



- Figura 4:



- Figura 5:



	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0002
	Àrea d'aplicació: Mostra d'esput	Versió: 1.0
		Data: 03/05/2019

- Figura 6:



- Figura 7:



- Figura 8:

