

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Mostres d'orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

PNT d'anàlisi microbiològic d'orina al laboratori

Laboratori de l'escola Jesuïtes el Clot.

Fet per **Gemma Torrodà, Ylenia Vico, Mikel del Valle, Rodrigo Muñoz i Marina Lloses.**
Divendres, 26 d'abril del 2019

Revisat per GeneLab

Aprovat el dijous, 2 de maig de 2019

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

ÍNDEX

1. Objectiu.....	pàgina 3
2. Responsabilitat de l'aplicació.....	pàgina 3
3. Definicions.....	pàgina 3
4. Descripció.....	pàgina 4
5. Registres.....	pàgina 10
5.1. Control de canvis.....	pàgina 11
6. Annexos.....	pàgina 12

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

1. OBJECTIU

El present PNT de laboratori té com a objectiu analitzar mostres d'orina que arriben a l'àrea de Microbiologia del laboratori de GRYPH LAB.

2. RESPONSABILITAT DE L'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.
- **Catalasa:** enzim que es troba en organismes vius i catalitza la descomposició de peròxid d'hidrogen amb oxigen i aigua.
- **H2O2:** aigua Oxigenada.
- **Oxidasa:** enzim que catalitza una reacció d'oxidació/reducció emprant oxigen molecular (O₂) com a acceptor d'electrons. En aquestes reaccions d'oxigen es redueix a aigua o peròxid d'hidrogen.
- **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 +.

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

- **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*)
- **Inòcul**: conjunt de microorganismes que es desenvolupen en un medi

4. DESCRIPCIÓ

En aquest PNT expliquem l'anàlisi microbiològic que pateix una mostra d'orina que es considera potencialment contaminada quan entra en el nostre laboratori.

Amb el conjunt de tècniques que realitzem, el que fem és analitzar les diferents mostres d'orina que ens arriben en busca de microorganismes infecciosos. Amb la finalitat de detectar quin és i així poder donar el tractament adequat. Aquest tipus d'anàlisi es fa quan es sospita d'una infecció de qualsevol part del sistema urinari.

La flora o la microbiota normal es troba en la part baixa de la nostra uretra, en qualsevol altra part es considera una infecció del tracte urinari.

Les principals tècniques que farem servir són l'urocultiu i la sedimentació de l'orina, així com un antibiograma per detectar quina és la sensibilitat del microorganisme als antibiòtics.

● Preparació de medis de cultiu

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.
- Tapar l'erlenmeyer amb paper de plata.
- Agafar un agitador magnètic amb calefacció, col·locar-lo, agitar-lo i pujar la temperatura al màxim.

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

- 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. *

Preparar TSA en tubs de vidre:

- 200 ml **TSA**.
- Per fer els càlculs mirar etiqueta del TSA
- Agafar un **Erlenmeyer** amb el volum necessari i tarar la balança.
- Amb una espàtula neta posar el TSA a l'Erlenmeyer.
- Amb una proveta graduada **enrasar** l'erenmeyer fins els 200 ml d'aigua destil·lada.
- Posar la mosca dins
- Tapar l'erenmeyer amb paper d'alumini
- Agafar un agitador magnètic amb calefacció, col·locar-lo, agitar-lo i pujar la temperatura al màxim.
- Esperar a que bulli.
- Traspasar 10ml a tubs de vidre
- Posar els tubs de vidre a una cubeta
- Posar cinta d'autoclau a la cubeta
- Autoclavar 15' a 121°
- Una vegada autoclavat, agafar un tub de 10ml i mesurar el ph.
- Deixar solidificar els tubs restants amb una inclinació de 45 graus.

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

Recollida de mostra d'orina

- Lliurar al pacient el recipient específic per la recollida d'aquesta mostra.
- Explicar al pacient com ha de recollir la mostra.
 - En primer lloc fer una bona neteja de mans i genitals.
 - En el cas dels homes han de retirar el prepuci.
 - En el cas de les dones han de separar els llavis vaginals.
 - Començar la micció fora del recipient i sense tallar la micció començar a omplir el recipient sense vessar el contingut.
 - Tancar el recipient correctament.
- Una vegada recollida la mostra s'ha de guardar a la nevera a 4°.
- Si la mostra ja ens arriba al recipient corresponent, hem de guardar-la a la nevera el més aviat possible fins que la fem servir.

Sembra i cultiu de la mostra: Fem diferents sembres a partir de la mostra d'orina que ens ha arribat: *

Sembra massiva en superfície:

- 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.
- Agafem amb una micropipeta 100 microlitres d'orina i els deixem anar en el centre de la placa de petri que conté agar nutritiu.
- Agafem una nansa de Digralski i extenem la mostra per tota la placa.
- Una vegada fet això ho posem a l'estufa durant 24h a 37°.
- Comprovar si hi ha creixement bacterià.

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.

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

- Ho posem a l'estufa durant 24h a 37°.
- Comprovar si hi ha creixement bacterià.
- Fer recompte de UFC.
- Seleccionar una colònia aïllada i fer tincions.

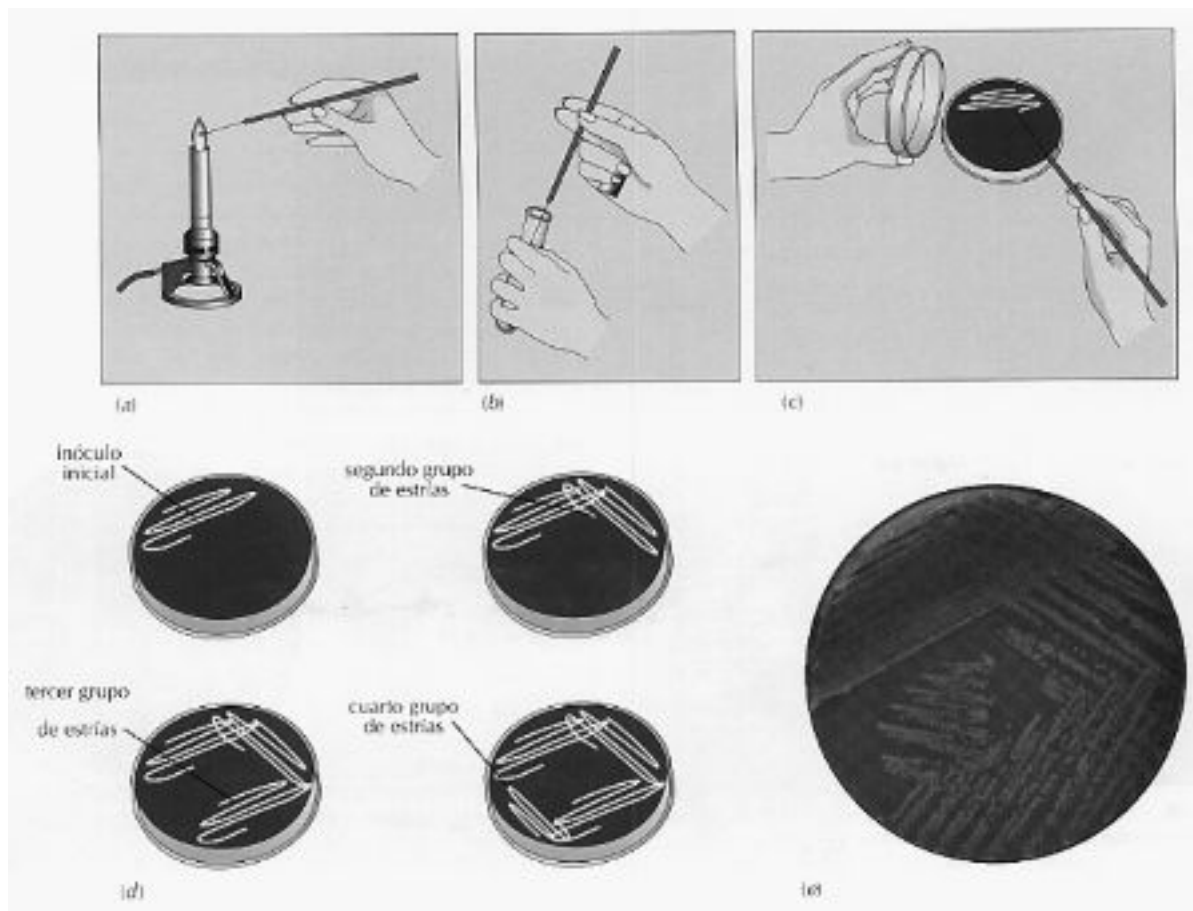


Figura 11.

● Tècniques d'identificació bacteriana

Una vegada tenim els cultius i podem visualitzar creixement hem de poder identificar la bacteria que està causant la infecció.

Per això tenim diverses tècniques, però la primera que farem serà la tinció de gram.

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

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.
- 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.

TINCIÓN DE GRAM		
Gram +	Pasos	Gram -
	Fijación	
	Colorante principal: cristal violeta	
	Mordiente: lugol	
	Decoloración: alcohol/acetona	
	Colorante de contraste: safranina	

Figura 12

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

Prova catalasa

- Posem una gota d'H₂O₂ sobre el portaobjectes amb l'ajuda d'una pipeta pasteur.
- Amb l'ajut d'una nansa prèviament esterilitzada amb el bunsen, posem bacteris obtinguts de la sembra damunt de la gota.
- Detectem la formació de bombolles. Si hi ha formació de bombolles és perquè el bacteri té l'enzim catalasa i descomposa l'H₂O₂.

(Figura 8 annexe)

Prova oxidasa

- Posem sobre un tros de paper de filtre bacteris obtinguts de la sembra amb l'ajuda d'una nansa.
- Vesar sobre els bacteris el reactiu de l'oxidasa
- Realitzem la lectura que es tarda 1min. En cas positiu el reactiu i els bacteris es tornen de color porpra. En cas negatiu el bacteri no canvia de color.

(Figura 9 annexe)

● **ANTIBIOGRAMA**

L'antibiograma és una prova que es realitza en una placa sembrada i serveix 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 35°C durant 24h
- Fer una lectura dels halus d'inhibició

(Figura 10 annexe)

	MANUAL DE PROCEDIMENTS		Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina		Versió: 1.0
			Data: 2/05/2019

5. 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	Registres	Gloria Estela	Canvis del Feedback (exemple)	Carpeta Drive

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

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 servir 2 tires reactives	Gemma Torrodà	Gemma	15/2/18	Per poder assegurar-nos del resultat	Implantat
1mm de sembra	Marina Lloses	Marina	26/7/18	És suficient 2 o er 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 en comptes de 200ml per fer més cultius	Avaluat

	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

6. ANNEXOS

- Figura 1:



- Figura 2:



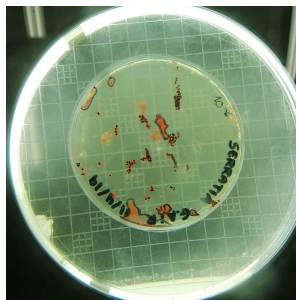
- Figura 3:



- Figura 4:



- Figura 5:



- Figura 6:

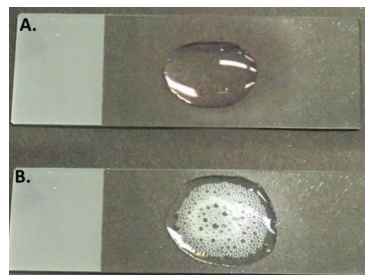


	MANUAL DE PROCEDIMENTS	Codi PNT: 0001
	Àrea d'aplicació: Orina	Versió: 1.0
		Data: 2/05/2019

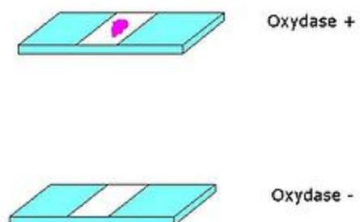
- Figura 7:



- Figura 8:



- Figura 9:



- Figura 10:

