



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
PARA EL APOYO EN LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMÍCA FARMACÉUTICA BÍOLOGA**

**PRESENTAN:
BARRERA MENDOZA ERIKA IVONNE
RODRÍGUEZ REYES DULCE ESPERANZA**

**ASESORAS: M.C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ
Q.F.B MARIA GUADALUPE VERA GABRIEL**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

	PÁGINA
INDICE GENERAL	II
ABREVIATURAS	III
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	VI
1.Objetivo General	1
1.1 Objetivos Particulares	1
2. Introducción	2
3. Breve descripción del Control de Calidad en el Laboratorio de Microbiología	3
3.1. Generalidades	3
4. Tipo de Muestras para Cultivo	5
4.1. Urocultivo	5
4.2.Exudado Vaginal	10
4.3.Exudado Uretral	15
4.4.Coprocultivo	19
4.5.Cultivo de Exudado Faríngeo y Nasofaríngeo	30
4.6.Cultivo de Esputo	36
4.7.Cultivo de líquidos de Derrame y Secreciones	40
4.8.Deteccion de Biofilms (cultivo de punta de catéter)	45
4.9.Hemocultivo	48
4.10. Exudado Ótico	54
4.11.Exudado Conjuntival	58
4.12.Cultivo de Líquido Cefalorraquídeo	62
5.Sensibilidad a Antimicrobianos	68
6. Monitoreo Ambiental	73
6.1. Control microbiológico de aire	74
6.2. Control microbiológico de Superficies y Manipuladores	76
7.Apéndice	78
A) Microscopía	78
B) Clasificación de Bacteria de Importancia Medica	85
C) Técnicas de Sembrado	87
D) Esterilización y Desinfección	90
E) Preparación de frotis y técnicas de tinción	93
F) Preparación de Medios de Cultivo	96
G) Técnicas Inmunoenzimáticas	99
H) Sistemas Comerciales de Identificación bacteriológica	105
I) Manejo Seguro de RPBI	110
8.Conclusiones	113
9.Referencias	114

ABREVIATURAS

%	Por ciento
Ac	Anticuerpo
ACh	Agar chocolate
Ag	Antígeno
AS	Agar sangre
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVL	Amibas de vida libre
BIGGY	Agar biggy
C.L.E.D	Agar Cistina Lactosa Electrólito Deficiente
CAMP	Christin, Aktins, Munch-Petersen
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de Carbono
CSeF	Caldo selenito
CT	Caldo tetrionato
dL	Decilitros
EH	Entérico Hektoen
EIA	Inmunoanálisis enzimático
ELISA	Ensayo inmuno-enzimático de adsorción
EMB	Agar Eosina y Azul de Metileno
etc.	Etcétera
ETS	Enfermedades de transmisión sexual
HCL	Ácido Clorhídrico
hrs.	Horas
IF	Inmunofluorecencia
ITU	Infecciones del tracto urinario
L.R	Límite de resolución
lb	Libras
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
m.o	Microorganismos
MC	Agar Mac Conkey
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
° C	Grados Centígrados
PAP	Peroxidasa-antiperoxidasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RIA	Radioinmunoensayo
rpm	Revoluciones por minuto
SBI	Agar Sulfito Bismuto
SDA	Agar Sabouraud
Seg.	Segundos
SM	Agar Sal y Manitol
sol.	Solución
spp.	Especie no especificada
SS	Agar Salmonella-Shigella
TCBS	Tiosulfato, Citrato, Sales biliares, Sacarosa
TH	Tood-Hewitt
TM	Agar Thayer Martin
TRI	Tracto respiratorio Inferior
TRS	Tracto respiratorio superior
TSI	Triple Azúcar Hierro
UFC	Unidades Formadoras de colonias
VB	Agar verde brillante
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida
XLD	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato
μ L	Microlitros

ÍNDICE DE TABLAS

N° de tabla	Título de la Tabla	Página
Tabla 1	Informe de urocultivo método cuantitativo.	8
Tabla 2	Porcentaje de los agentes etiológicos en infecciones vaginales.	11
Tabla 3	Etiología de agentes patógenos en coprocultivo.	20
Tabla 4	Reacciones Bioquímicas para Enterobacterias.	25
Tabla 5	Etiología de agentes patógenos en Faríngeo y Nasofaríngeo.	30
Tabla 6	Etiología de agentes patógenos en cultivo de esputo.	37
Tabla 7	Etiología de agentes patógenos en cultivo de secreciones.	40
Tabla 8	Flora patógena de conjuntivitis.	59
Tabla 9	Características citológicas de Infección conjuntival.	59
Tabla 10	Características citoquímicas de LCR en diferentes patologías.	62
Tabla 11	Etiología de agentes patógenos en Líquido Cefalorraquídeo.	63
Tabla 12	Principales sistemas Comerciales para monitoreo de aire.	75
Tabla 13	Análisis de superficies.	76
Tabla 14	Áreas físicas de monitoreo ambiental hospitalario.	77
Tabla 15	Clasificación de los desinfectantes.	92
Tabla 16	Técnicas de tinción para bacterias.	94
Tabla 17	Constituyentes habituales de los medios de cultivo.	96
Tabla 18	Tipos de medios de cultivo.	97
Tabla 19	Sistemas automatizados para identificación y estudio de susceptibilidad bacteriana según el método de detección, marca registrada y fabricante.	105
Tabla 20	Pruebas bioquímicas con las que cuenta el sistema API.	107
Tabla 21	Ventajas de los sistemas automatizados de estudio de susceptibilidad bacteriana.	108
Tabla 22	Desventajas de los sistemas automatizados de estudio de susceptibilidad bacteriana.	109
Tabla 23	Clasificación en base a características físicas y biológicas infecciosas de RPBI.	111

ÍNDICE DE FIGURAS

N° de figura	Título de figura	Página
Figura 1	(a)Esquema correspondiente al tracto genital femenino; (b) Bacterias que constituyen la flora vaginal normal.	10
Figura 2	Toma de muestra de Exudado Cervico Vaginal.	12
Figura 3	Toma de muestra de Exudado Uretral.	16
Figura 4	Tinción de Gram de <i>Campylobacter</i> .	22
Figura 5	Toma de muestra de Exudado Faríngeo.	32
Figura 6	Toma de muestras de Exudado Nasofaríngeo.	33
Figura 7	Cultivo mediante técnica de Maki y detección del biofilm.	46
Figura 8	Ejemplos del origen de los cuadros de bacteremia transitoria, intermitente y continua.	49
Figura 9	Técnica aséptica para la obtención de muestras de sangre para hemocultivo.	50
Figura 10	Inoculación de hemocultivos positivos.	51
Figura 11	Toma de muestra de Exudado Ótico.	55
Figura 12	Toma de muestras de Exudado Conjuntival.	60
Figura 13	Toma de muestras de Líquido Cefalorraquídeo.	64
Figura 14	El método de difusión de disco Kirby Bauer.	70
Figura 15	Sistema comercial Air IDEAL de Biomériux.	75
Figura 16	Esquema de Microscopio Óptico.	80
Figura 17	Clasificación de bacterias Gram positivas.	85
Figura 18	Clasificación de bacterias Gram negativas.	86
Figura 19	Técnica de Sembrado en placa.	89
Figura 20	Fijación de un frotis.	93
Figura 21	Preparación de Medios de Cultivo.	98
Figura 22	Esquema de Inmunofluorescencia directa e indirecta.	99
Figura 23	Técnica de ELISA directa.	100
Figura 24	Técnica de ELISA indirecta.	101
Figura 25	Técnica de Peroxidasa aplicada a tejidos.	102
Figura 26	Esquema de PCR.	104
Figura 27	Ejemplos de clasificación de RPBI.	112

1. OBJETIVO GENERAL

Elaborar un manual de Microbiología considerando exámenes de mayor relevancia que dentro del campo de la clínica apoyan al diagnóstico médico de infecciones microbianas, que sirvan de base a quienes en forma interesada y de servicio se superan cada día dentro de su campo de acción.

1.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar un manual el cual sirva de base para el procesamiento de cultivos microbiológicos.
- Asegurar una correcta toma y procesamiento de muestras biológicas.
- Homogenizar y actualizar los criterios que se tienen en el campo de diagnóstico de la microbiología.
- Sistematizar los procedimientos de manejo de cultivos microbiológicos.

2. INTRODUCCIÓN

La Microbiología es un área del diagnóstico clínico que más preparación requiere por el ejecutante en estudio, ya que es difícil conjuntar todas las ideas que sobre esta rama se pueden tener. El propósito de este Manual de Microbiología es mantener de una manera sistematizada la identificación de los microorganismos clínicamente relevantes para el diagnóstico etiológico de las infecciones Microbianas, el microbiólogo debe mantenerse constantemente actualizado y capacitado debido a los constantes cambios y avances que se dan en este campo.

En el diagnóstico microbiano, la clasificación, la nomenclatura y la identificación de los microorganismos desempeñan un papel central, porque proporcionan el diagnóstico exacto y oportuno de las enfermedades infecciosas.

La clasificación es la organización en grupos específicos o taxones de microorganismos que comparten características morfológicas, fisiológicas y genéticas similares. El género es el próximo taxón más alto y comprende especies diferentes, que tienen varias características importantes en común, pero difieren lo suficiente como para mantener su estado como especies individuales.

La Nomenclatura, que es la denominación de microorganismos de acuerdo a las reglas y normas establecidas, proporciona los nombres aceptados por los cuales los microorganismos son reconocidos en todo el mundo.

La identificación microbiana es el proceso por el cual se delinean las características más importantes de un microorganismo. Una vez establecidas estas características, el perfil se compara con los de otros microorganismos caracterizados con anterioridad, para que el microorganismo en cuestión pueda clasificarse y se le pueda asignar género y especie apropiada. (1)

Es así que en el diagnóstico microbiológico las técnicas utilizadas dependen en gran medida de las características biológicas de los microorganismos que se pretenden detectar. El diagnóstico de las infecciones microbianas se efectúa mediante exámenes microscópicos, cultivo de la muestra clínica obtenida del foco de infección (pus, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) y algunos otros como serológicos o de biología molecular. Estos procedimientos permiten visualizar, aislar e identificar los microorganismos causantes de infección, estudiando posteriormente su sensibilidad a los antimicrobianos.

El laboratorio clínico de microbiología, requiere para su correcto funcionamiento de un adecuado y constante control de calidad sobre todas las etapas de recepción, manejo y reporte de especímenes clínicos. En general este control debe identificar, monitorear, evaluar y aprobar metodologías relativas al cuidado del paciente. (2)

3. BREVE DESCRIPCIÓN DEL CONTROL DE CALIDAD

3.1. Generalidades

El control de calidad en microbiología clínica envuelve el monitoreo de los medios de cultivos, reactivos, instrumentos, procedimientos y el personal, para asegurar una adecuada práctica en el aislamiento, identificación y caracterización de agentes etiológicos y sus correspondientes pruebas de susceptibilidad de tratamiento. (28)

Un programa de control de calidad debe incluir además un Manual de Procedimientos, validación de metodologías y equipos, el desarrollo de ciclos de educación continua, elementos de bioseguridad y una supervisión sobre los reportes generados. En éste sentido se hace énfasis en la correcta valoración de las pruebas de laboratorio, los agentes causales de enfermedades, el conocimiento de la flora normal, la taxonomía microbiana y la interpretación correcta de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, lo que implicaría desarrollar otro trabajo en control de calidad, pero para resumirlo de manera que se tenga una idea básica acerca del tema lo abordaremos de una forma muy breve:

El **Aseguramiento de la Calidad**, es un concepto más difícil de cuantificar que el control de calidad, ya que su foco es el impacto de las pruebas de laboratorio en el cuidado del paciente. Este control nos indica que tan bueno es nuestro trabajo y establece mecanismos para asegurar la generación de información de utilidad clínica rápida y segura. Este concepto incluye entrenamiento y calificación del personal, evaluación de los reportes, rapidez y seguridad diagnóstica, certificación de los laboratorios, controles externos, etc. El Control de Calidad y el Aseguramiento de la calidad son similares en sus propósitos, aunque su significado y su manera de funcionar sean diferentes; sin embargo, ambos conceptos deben desarrollarse interactivamente durante un programa de control de calidad. (28)

El control de calidad en el laboratorio de microbiología tiene como objetivo, que el producto final del trabajo tenga un grado aceptable de seguridad, de conformidad con los límites establecidos. Debido a que la mayoría de los resultados en bacteriología son producto de interpretaciones y evaluación de reacciones bioquímicas de seres vivos, donde la capacidad y experiencia del evaluador tienen un gran valor, los cálculos de coeficientes de variación y desviaciones estándares que son parte de funciones analíticas, tienen poca aplicación en el laboratorio de microbiología.

Un programa de control de calidad debe contar con los siguientes elementos mínimos:

- Las pruebas y los procedimientos.
- Verificación y validación del test.
- Manual de procedimientos.
- Mantenimiento de reportes y libros de registros.
- Evaluación del personal.
- Controles internos y externos.
- Validación de equipos.

El programa evalúa y documenta el desempeño de todos los aspectos de un procedimiento. Esto incluye la calidad del espécimen, la eficiencia de los reactivos, medios e instrumentos y verifica los resultados del test por errores. (28)

El Manual de Procedimientos del laboratorio de microbiología, debe contener todos los aspectos relevantes en la operación del laboratorio y la generación de reportes que tienen que ver con la salud de los pacientes.

El factor más importante en la generación de reportes microbiológicos de calidad corresponde al personal. El personal del laboratorio de microbiología debe ser seleccionado con base en sus cualidades académicas y personales. Debe poseer habilidad para ejecutar pruebas complejas, la mayoría de las veces manuales, interés en mantenerse al día en los procedimientos y taxonomía microbiana, excelente concepto de protección de grupo y de bioseguridad en general. (28)

El control de calidad en resumen, es un elemento vital en el laboratorio, ya que ayuda en la confiabilidad de las pruebas, su reproducibilidad, asegura la calidad de los materiales, reactivos y equipos empleados, mejora la auto confianza del personal, detecta fallas que pueden reflejarse en el informe de resultados y en general provee un entorno de excelencia en todos los aspectos del trabajo. (28)

4. TIPO DE MUESTRAS PARA CULTIVO

4.1. Urocultivo

Las infecciones del tracto urinario se definen como la presencia anómala y elevada de bacterias en orina recogidas por micción normal. La orina es un líquido estéril y se encuentra en la vejiga, por tanto mediante punción en la zona suprapúbica debería de estar libre de gérmenes. La morbilidad y la mortalidad que pueden asociarse a distintos cuadros clínicos asociados a los Infecciones del tracto urinario (ITU) constituyen un reto para poner tratamiento adecuado que depende de la bacteria involucrada en la etiología y del cuadro clínico del paciente. (9)

El urocultivo se utiliza para diagnosticar bacteriuria, la orina constituye un método excelente para cultivar la mayor parte de microorganismos que infectan el aparato urinario. (9)

Epidemiología

Son junto con las infecciones respiratorias las que mayor número de casos se producen en hospitales (nosocomiales). El mayor número de casos es en las mujeres en edad fértil, ya que juega papel importante la proximidad del meato urinario con el ano, y anatómicamente la vejiga de la mujer es menor que la del hombre. También es bastante frecuente en la edad senil, en mujeres embarazadas, en hombres donde hay disminución del chorro urinario. En los neonatos masculinos las infecciones urinarias son mayores que en los neonatos femeninos, debido a que el prepucio retiene la orina. (9)

Etiología

En más de un 80% en el medio ambulatorio y en torno a un 40% en los medios nosocomiales está producido por *Escherichia coli*, hay otras Enterobacterias como las del género *Proteus* (sobre todo de mayor incidencia *Proteus mirabilis*) está relacionado en infecciones de embarazadas y hombres que producen litiasis (formándose cristales de estrubita como consecuencia de la presencia de ureasa de las bacterias). También del género *Klebsiella* cuyos azúcares de su cápsula también pueden producir litiasis, *Enterococcus faecalis* y la *Pseudomonas* (de menor incidencia). También son muy importantes los *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. (9)

Candidatos

Ante la sospecha de infección del tracto genitourinario es necesario el envío de una muestra de orina al laboratorio.

Toma de muestra

Orina por vaciado directo

- Se recomienda recoger la primera orina de la mañana al despertar.
- Cuidosa limpieza de la región urogenital con agua y jabón. Secar con un paño limpio.
- Se instruye al paciente. para que deseche la primera parte de la micción y se colecta el chorro medio en un frasco estéril.
- La muestra se debe enviar de inmediato al laboratorio, si no se puede refrigerar la orina hasta 2 horas.
- No utilizar orina de pool de 24 horas. (5)

Esta técnica no es apropiada para niños que no controlan sus esfínteres, en cuyo caso se procede a hacer limpieza de los genitales y a fijar un recolector de orina estéril (especial para bebés). Se deja en esta posición hasta que el niño realice su micción; se despeja el recolector y se sella inmediatamente. No debe dejarse colocado el recolector por tiempo prolongado. La alta probabilidad de contaminación en muestras de orina de lactantes, obliga a realizar el estudio en tres muestras sucesivas de micción espontánea. (5)

Orina por cateterización

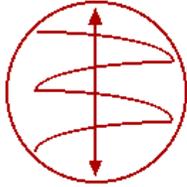
- Limpie la porción del catéter donde se va a tomar la muestra de orina con alcohol etílico al 70% o cloruro de benzalconio al 1%
- Inserte la aguja dentro del catéter y colecte la orina dentro de la jeringa.
- Transfiera la orina a un envase estéril. (5)

Orina por Aspiración suprapúbica

- Descontamine y anestesia el área de punción.
- Introduzca la aguja calibre 22 dentro de la vejiga entre el pubis y el ombligo.
- aspire alrededor de 20 mL de orina y transfiera a un envase estéril.
- Proceder a la siembra inmediatamente, de no ser así refrigerar la muestra o tomar la muestra en presencia de inhibidores del crecimiento bacteriano (tiosulfato sódico). (5)

Procedimiento

EXAMEN CUANTITATIVO



Método del asa calibrada.

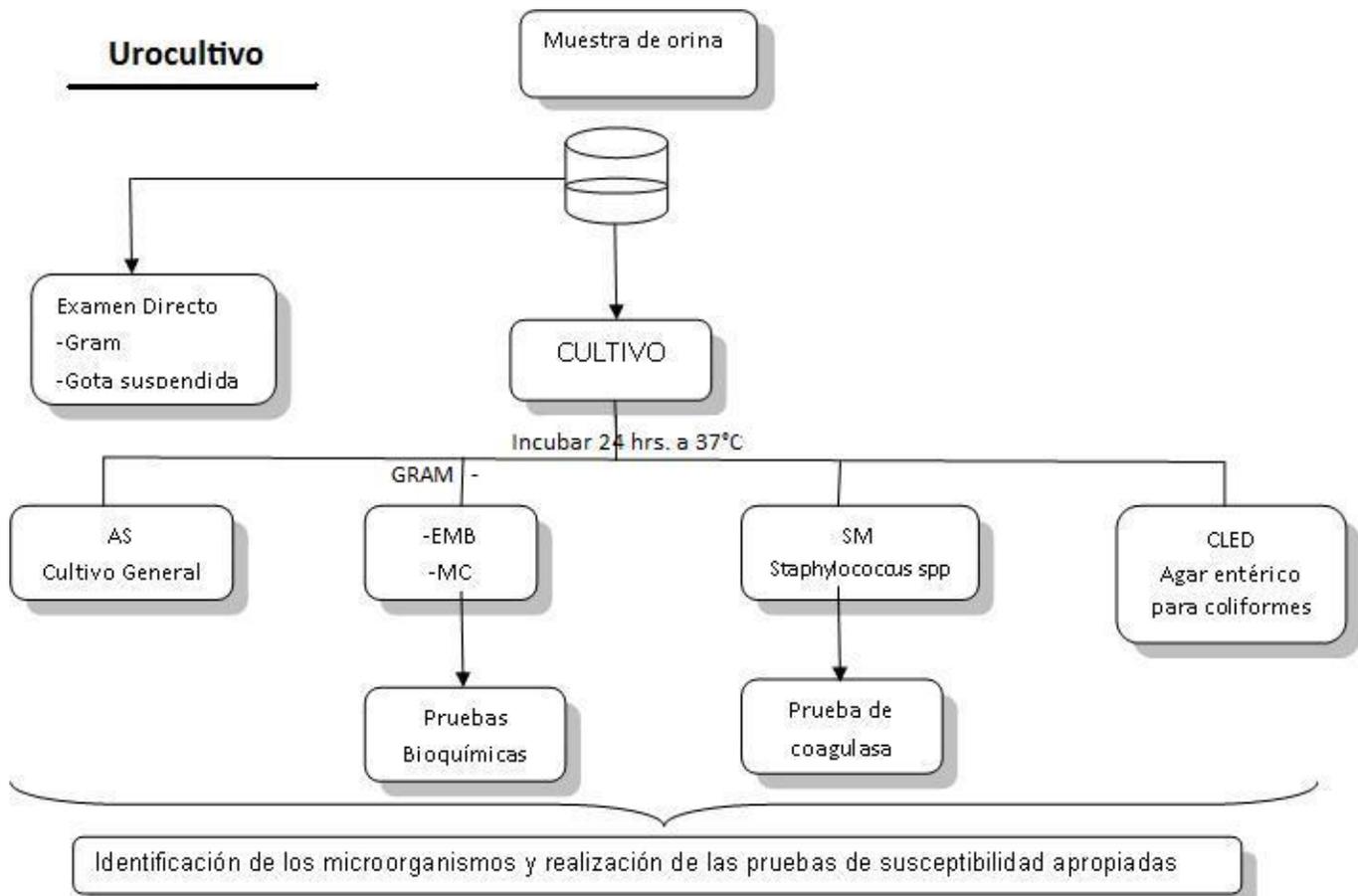
Esta estimación cuantitativa consiste en sembrar una placa con medio de agar-sangre o agar con CLED en una muestra de orina, sin centrifugar, empleando asa de platino calibrada (4 mm. de diámetro). Después de incubar las siembras a 37°C durante 24 a 48 horas, se cuenta el número de colonias desarrolladas y el resultado se multiplica por 100, ya que el asa bacteriológica de platino calibrada contiene 0.01 mL. (10 µL) de orina. (30)

En el cultivo de la orina se cuantifica el número de bacterias presentes, y se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC) por mL, una UFC representa una bacteria. El termino UFC se emplea porque el urocultivo se realiza sembrando 1 ó 10 microlitros de orina en una placa de cultivo y contando la aparición de colonias bacterianas visibles a simple vista en las primeras 24 horas. Por lo tanto si sembramos:

1µL se multiplica por 1000

10 µL se multiplica por 100

Para obtener el número de colonias por mL de orina. (30)



INFORME

Este es el modelo del Comité de Expertos de la Sociedad Americana de Enfermedades infecciosas. Sustituye a las definiciones de Kass empleadas hasta la década de los 90 para informar el urocultivo. (31)

Tabla 1. Informe de urocultivo método cuantitativo.

Urocultivo negativo	No se observa crecimiento bacteriano o bacteriuria <100 UFC/mL de una especie microbiana.
Bacteriuria simple	>100 UFC/mL de una especie microbiana uropatógena con sedimento patológico ó <1000 UFC/mL con sedimento patológico.
Bacteriuria asintomática	Bacteriuria <100 000 UFC/mL de una especie microbiana y sedimento negativo.
Bacteriuria significativa	>100 000 UFC/mL de una especie microbiana y sedimento patológico.
Bacteriuria complicada	>100 000 UFC/mL de dos agentes bacterianos (<i>Enterobacterias</i>) con sedimento reactivo.
Prostatitis aguda	Cualquier recuento (<i>Enterobacterias</i>).
Muestra contaminada	Recuento > 10 000 UFC/mL con más de 2 tipos microbianos.

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Nombre: Daniela González Ortiz			
Folio: 16030024	Edad: 25 años	Sexo: F	Fecha de Recibido: 16/03/11
UROCULTIVO			
Tipo de Muestra: Orina			
Características de la muestra: Se recibe muestra color ámbar, aspecto turbio.			
Gram: Bacilos Gram negativos.			
Identificación: <i>Escherichia coli</i> Cuantificación: > 100 000 UFC/mL			
Antibiograma: Amikacina R Ceftriaxona S Norfloxacin S Ampicilina R Gentamicina S Ceftazidima S Cefalotina R Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Cefepime S			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11	Elaboró: QFB Esperanza Reyes	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Méza	

4.2. Exudado Vaginal

El cómo y por qué se instala una enfermedad infecciosa en la vagina se explica conociendo los obstáculos que encuentra el agente infeccioso para su implantación en condiciones normales o las facilidades que se le pueden presentar si estas condiciones se alteran. (9)

Resulta importante recordar que la vagina sana presenta una secreción derivada del cuello del cérvix y en ella hay que tomar en cuenta el grosor del epitelio, el depósito de glucógeno, su pH y el contenido de la flora lactobacilar, los cuales varían dependiendo de la edad, ciclo menstrual y hábitos sexuales e higiénicos. La normalidad fisiológica de la vagina con lleva también la multiestratificación y un sistema de eliminación de bacterias regido por descamación epitelial y la presencia de inmunoglobulinas locales. (9)

Cuando se presenta un factor predisponente, como un desequilibrio de origen hormonal, alguna enfermedad metabólica, desnutrición, tuberculosis, abuso de duchas vaginales con antisépticos locales, inmunodepresión por diferentes agentes, se observa la desaparición del bacilo de Döderlein por lo que se pueden presentar procesos infecciosos como vaginitis, cervicitis o vaginosis bacteriana ocasionadas por microorganismos oportunistas que son parte de la microbiota normal o microorganismos patógenos.(9)

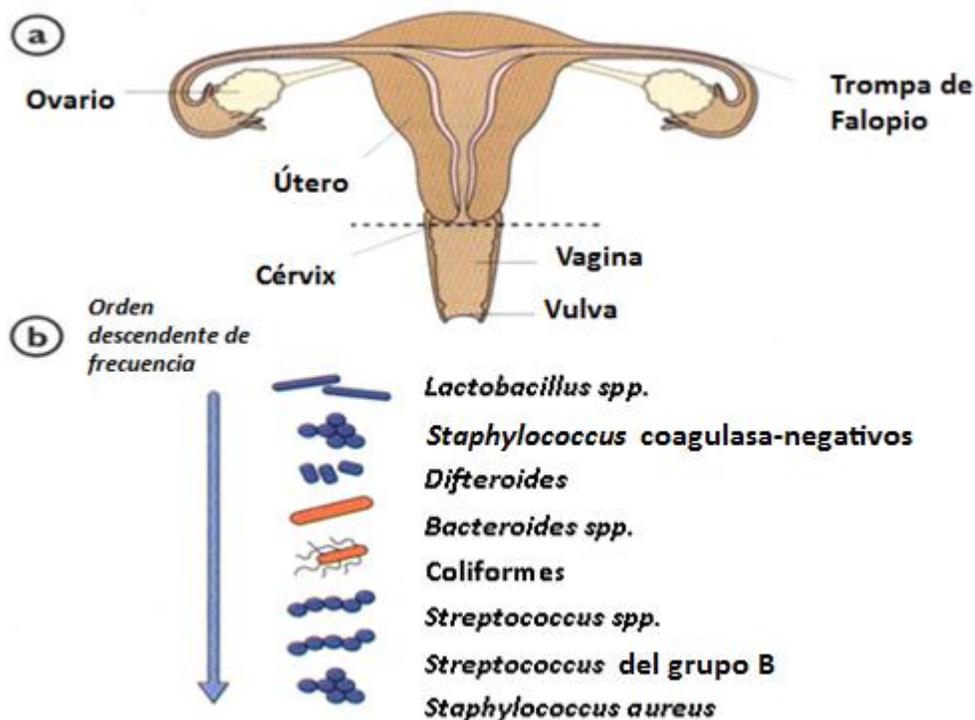


Figura 1. (a) Esquema correspondiente al tracto genital femenino. (b) Bacterias que constituyen la flora vaginal normal; Fuente: J.K. Struthers, R.P. Westran, "Bacteriología Clínica" 2005.

Epidemiología

Las infecciones cervico-vaginales se presentan con una incidencia de 7 - 20% de las mujeres por año. Su significado e importancia clínica tienen que ver con implicaciones de orden social; las infecciones transmitidas por contacto sexual son debidas a factores como edad, sexo, comportamiento sexual, clima, promiscuidad, factores del agente causal como virulencia.

La frecuencia de infección sistémica neonatal parece estar en función directa con el porcentaje de colonización vaginal y es importante causa de morbi-mortalidad en neonatos.

La solicitud de estudio de exudado vaginal debe de ir acompañada del diagnóstico presuntivo o algunos datos clínicos que puedan orientar la investigación de microorganismo. (9)

Etiología

La frecuencia de infecciones cervico-vaginales que reportan las estadísticas en México en los últimos años muestra en la siguiente tabla los principales agentes etiológicos. (32)

Tabla 2. Porcentaje de los agentes etiológicos en infecciones vaginales. Fuente: Rivera-Sánchez, Et al, Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México.

Agente Etiológico	%
<i>Gardnerella vaginalis</i>	22.65
<i>Candida spp</i>	19.13
<i>Candida albicans</i>	7.8
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1.5
<i>Streptococcus del grupo D</i>	11.78
<i>Streptococcus del grupo B</i>	4.59
<i>Escherichia coli</i>	13.46
<i>Klebsiella spp</i>	2.0
*Además de otras enterobacterias menos frecuentes como <i>Citrobacter spp</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Pseudomonas spp</i> , <i>Morganella morganii</i> y <i>Proteus mirabilis</i> . El 2.9% presentó anaerobios siempre asociados con <i>Gardnerella vaginalis</i> .	

Chlamydia trachomatis es una bacteria de distribución universal y produce enfermedades de transmisión sexual, y generalmente se detecta a través de pruebas especiales como inmunofluorescencia.

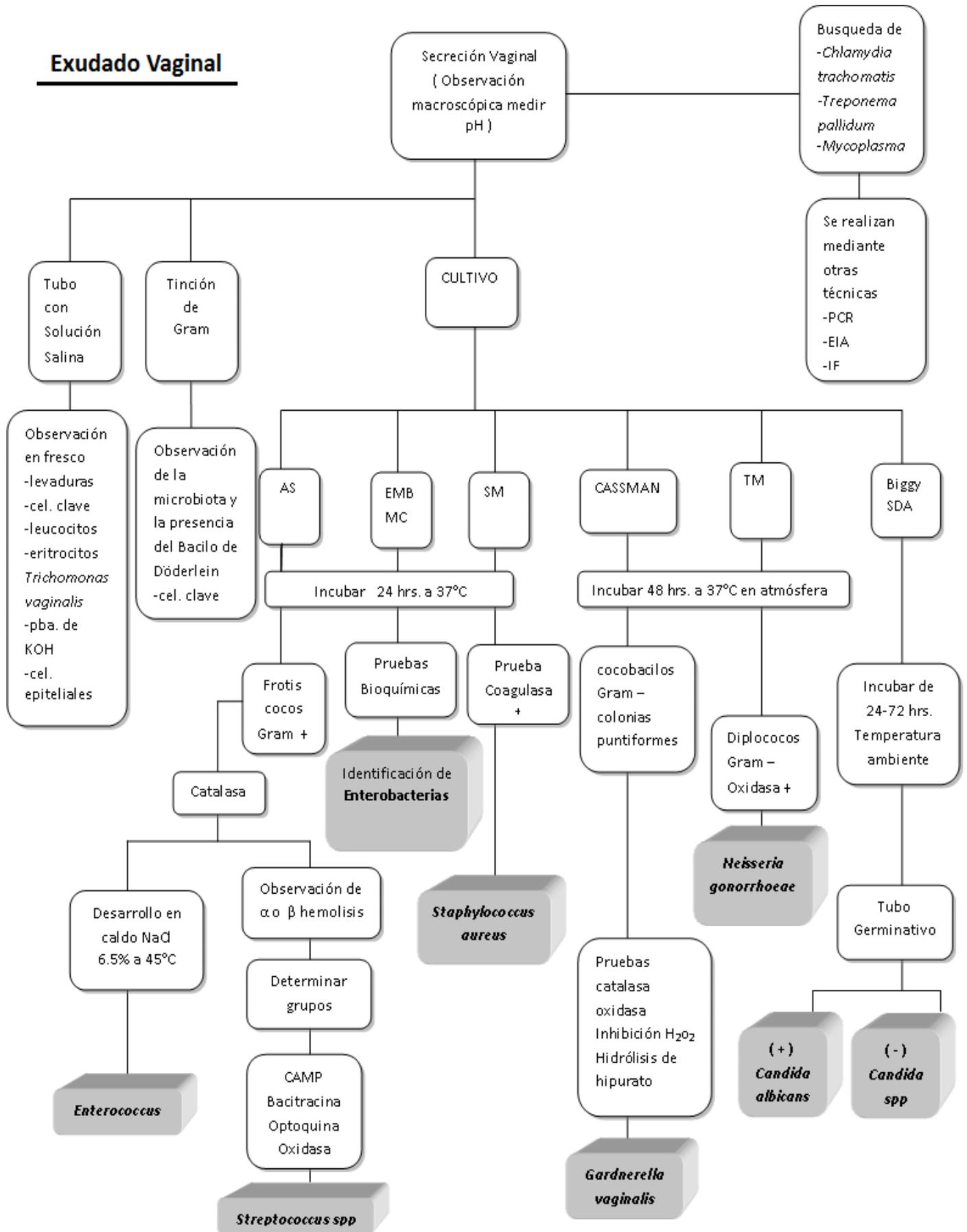
Toma de muestra de cultivo cervico-vaginal



Figura 2. Toma de muestra de cultivo cervico-vaginal; Fuente:blogspot.com/.../citología+vaginal.jpg

- Recoger la muestra, bajo visión directa, con un hisopo, de la zona con mayor exudado, o en su defecto, del fondo de saco vaginal posterior, pues es donde mejor conservada esta la muestra.
- La toma puede realizarse con: asa de platino, espátula, escobillón, (para estudios de citología) utilizar el escobillón de algodón, facilita el posterior procesamiento, lo aplicamos en el lugar elegido.
- Se obtendrán tres hisopos, uno destinado al estudio microscópico en fresco el segundo a la elaboración de un frotis para teñir por Gram y el otro al cultivo en medios.
- El procesamiento de la muestra debe ser inmediato siempre que sea posible, de lo contrario debe emplearse medio de transporte tipo Stuart, que se mantendrán a temperatura ambiente o en estufa 35-37°C. hasta su procesamiento, este deberá ser antes de 3-6 horas.(32)

Exudado Vaginal



INFORME

Flora Patógena

- Endógena: Son de la microbiota normal pero producen una patología por un desequilibrio: *Cándida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma* y anaerobios. (32)
- Exógena: no forma parte de la flora y puede ser introducida por ETS o por maniobras instrumentales. (32)

-*Candida albicans*

-*Gardnerella vaginalis*

-*Mycoplasma*

-*Chlamydia trachomatis*

-*Trichomonas vaginalis*

-*Treponema pallidum*

-*Neisseria gonorrhoeae*

-Anaerobios

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			
Nombre: Daniela González Ortiz			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Folio: 16030024	Edad: 25 años	Sexo: F	
CULTIVO DE EXUDADO VAGINAL			
Tipo de Muestra: Exudado Vaginal			
Características de la muestra: Abundante flujo amarillento, con olor característico.			
Fresco pH 5 Leucocitos 1 - 3 p/c Bacterias +++ Cel. Clave ++ Cel. Epiteliales Moderadas KOH Positivo <i>Trichomonas vaginalis</i> No se observan			
Identificación: <i>Gardnerella vaginalis</i>			
Antibiograma: No aplica			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11	Elaboró: QFB Erika Barrera	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Méza	

4.3. Exudado Uretral

La uretritis es una inflamación de la uretra y puede ser causada por bacterias o virus. Las mismas bacterias que causan las infecciones de las vías urinarias (*Escherichia coli*) y algunas enfermedades de transmisión sexual (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea*) pueden llevar a que se presente uretritis. Las causas virales de la uretritis incluyen el virus del herpes simple y el citomegalovirus (6), que pueden evaluarse en cultivo celular o en pruebas especiales para virus.

Las personas que son sensibles a las sustancias químicas utilizadas en espermicidas o jaleas, cremas o espumas anticonceptivas pueden sufrir uretritis. Esta afección también puede ser causada por una lesión. (6)

El riesgo mayor de desarrollo de uretritis está asociado con hombres entre 20 y 35 años, aquellos con parejas sexuales múltiples y los que presentan un comportamiento sexual de alto riesgo (como relaciones sexuales anales sin condón). Igualmente, se encuentran en riesgo las mujeres jóvenes en edad reproductiva. Así mismo, el hecho de tener antecedentes de enfermedades de transmisión sexual (ETS) aumenta el riesgo de padecer uretritis. (6)

Etiología

Se diferencia en uretritis gonococcica causada por *Neisseria gonorrhoeae* y uretritis inespecífica causada principalmente por *Chlamydia trachomatis*, *Ureplasma urealyticum*, Herpes simple, *Trichomonas vaginalis* y poco frecuente por *Candida albicans* y *Staphylococcus saprophyticus*, entre otros. (9)

Epidemiología

Los sujetos de sexo masculino infectados habitualmente no presentan signos y síntomas (50 - 90%), aunque recientemente se ha reportado un mayor número de casos de uretritis no gonocócica (uretritis con descarga uretral clara o mucopurulenta y disuria) ocasionalmente aunado a epididimitis, e incluso a pequeñas ulceraciones en pene. También se han reportado prostatitis, balanitis, infertilidad (10%) asociada a baja motilidad y disminución en viabilidad de los espermatozoides. Los sujetos sintomáticos VIH positivos presentan altos números de partículas virales en líquido seminal. (9)

Más de 250 millones de personas en todo el mundo se infectan cada año con gonorrea. En cuanto a la sífilis, las cifras indican 50 millones de personas en todo el mundo. Otras enfermedades de transmisión sexual, como la tricomoniasis y el herpes genital, probablemente son más frecuentes, pero como los médicos no tienen la obligación de comunicarlas a las autoridades epidemiológicas en salud y organismos públicos, las cifras son menos fiables. (6)

Toma de la muestra.

Con dos hisopos se toma la secreción o bien caso de ausencia de exudado se introduce el hisopo de alginato (que es más delgado, largo y flexible) a través del canal uretral 3 o 4 cm. Girar suavemente y retirar. Hacer un frotis delgado por rotación y teñirlo por Gram y sembrar directamente a los medios como se indica en el diagrama siguiente:

Toma de muestra

Exudado Uretral

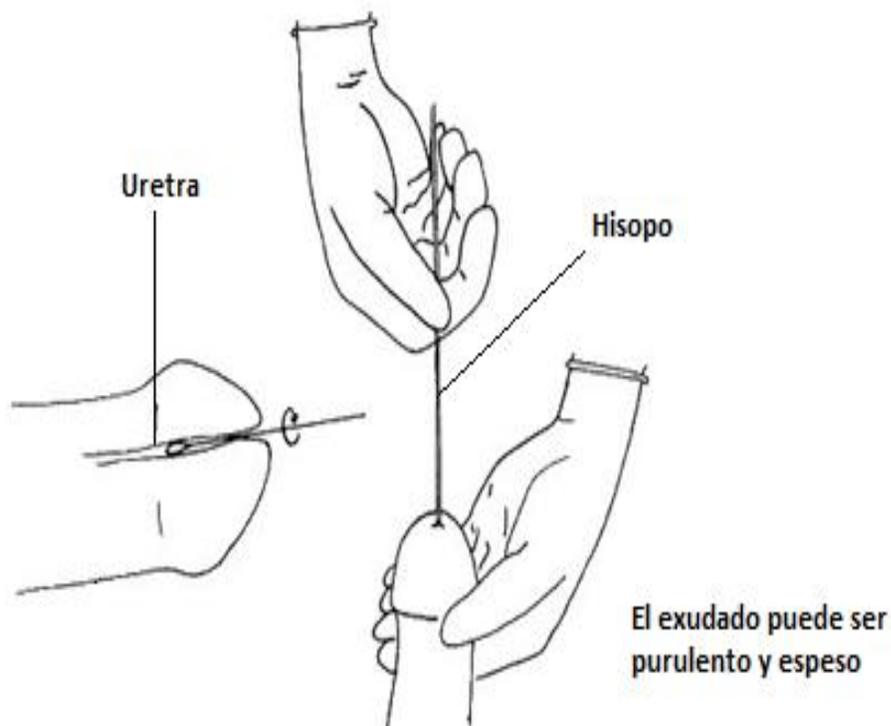
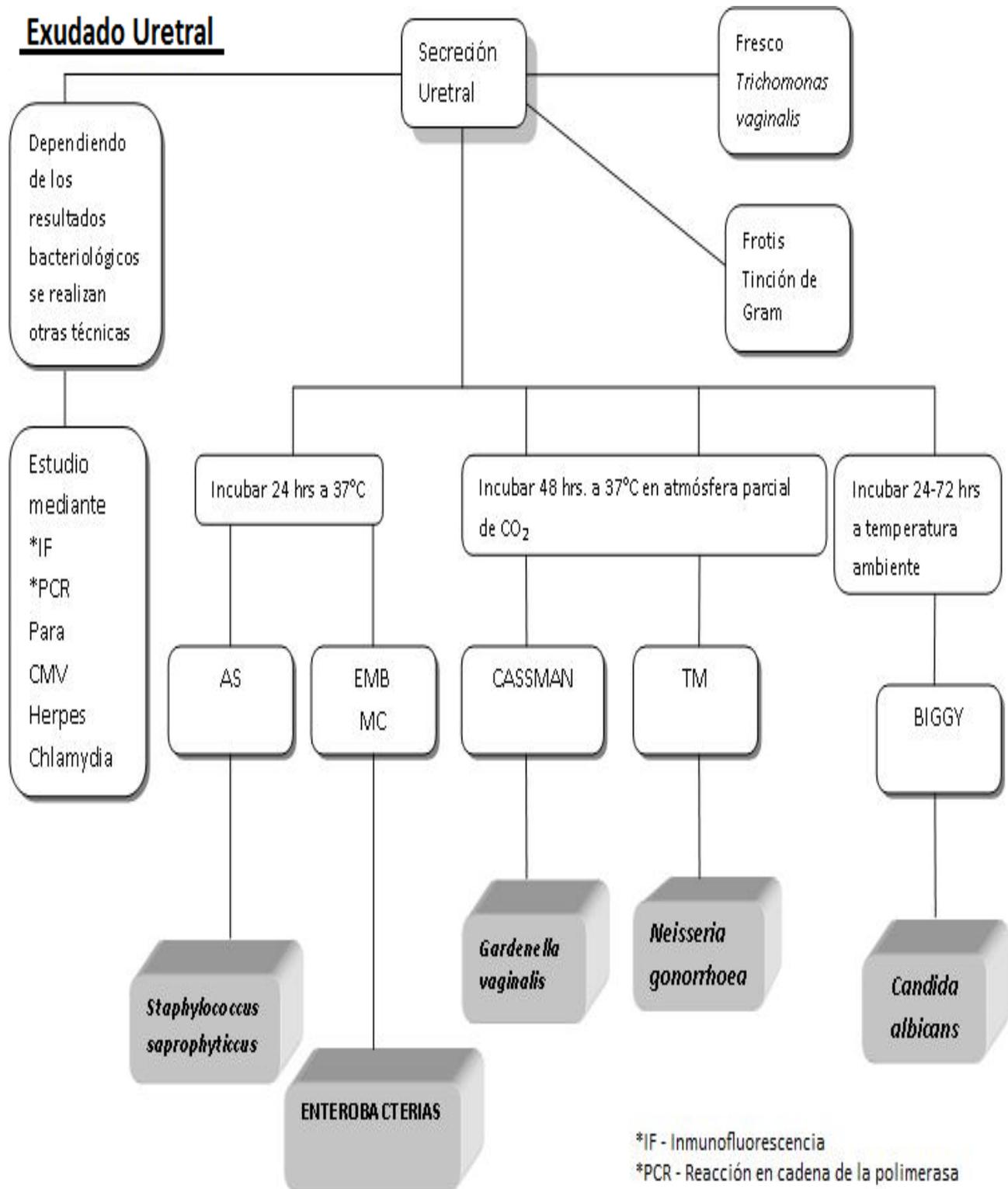


Figura 3. Toma de muestra de exudado uretral; Fuente: raulcalasanz.files.wordpress.com/2010

Exudado Uretral



*IF - Inmunofluorescencia
*PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

INFORME

- Neisseria gonorrhoeae*
- Chlamydia trachomatis*
- Ureplasma urealyticum*
- Trichomonas vaginalis*
- Candida albicans*
- Staphylococcus saprophyticus*
- Herpes simple
- Citomegalovirus

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Nombre: Gonzalo Juárez Martínez			
Folio: 16030024	Edad: 35 años	Sexo: M	Fecha de Recibido: 16/03/11
CULTIVO DE EXUDADO URETRAL			
Tipo de Muestra: Exudado Uretral			
Características de la muestra: Paciente con flujo uretral blanquecino.			
Gram: Levaduras que se tiñen Gram positivas			
Identificación: <i>Candida albicans</i>			
Antibiograma: No aplica			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11	Elaboró: QFB Erika Barrera	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Méza	

4.4. Coprocultivo

La enfermedad diarreica es un síndrome de etiología multicausal en la que el evento primario suele ser la interacción del organismo con agentes infecciosos virales, bacterianos y parasitarios los eventos secundarios corresponden a las consecuencias del daño producido por estos agentes al organismo, particularmente al epitelio digestivo, en forma de pérdidas anormales de agua y sales, en la alteración en la digestión y absorción de nutrimentos (como la intolerancia a la lactosa) y secundariamente, en la afectación del estado nutricional y el desarrollo de alergia alimentaria.

Los mecanismos de acción de los agentes infecciosos asociados con la enfermedad diarreica son muy diversos, ya que mientras los virus no suelen inducir respuesta inflamatoria, en las infecciones por bacterias enteroinvasivas pueden presentarse evacuaciones con moco y sangre, además de leucocitos en las heces. (10)

Epidemiología

Las infecciones gastrointestinales son la primera causa de muerte en población infantil, sobre todo en menores de cinco años de edad, cuyo intervalo establece que 8 de cada 10 niños las padecen.

De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social, las infecciones como gastroenteritis, salmonelosis, tifoidea, cólera a excepción de rotavirus, representan un problema severo de salud pública, a pesar de la reducción de la mortalidad en los últimos 20 años y se incrementan en temporada de calor. (11)

Tabla 3. Etiología de agentes patógenos en coprocultivo

PATÓGENO	RELEVANCIA
<i>Escherichia coli</i> Diarrogénica	Se caracterizan mediante métodos moleculares no accesibles en laboratorios de 1er Nivel de atención de salud.
<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	Diarrea aguda endémica y epidémica en lactantes, ocasionalmente diarrea persistente.
<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa	Diarrea aguda y persistente.
<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	Todas la edades, diarrea del viajero, puede haber brotes de invierno que acompañen rotavirus.
<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	Enfermedad similar a la ocasionada por <i>Shigella spp.</i>
<i>Shigella spp.</i>	Causa común de disentería y diarrea acuosa, en México predomina en época de calor y es rara en los primeros 2 años de vida. En el 50 % es asintomática predomina <i>Shigella Flexneri</i> y <i>S. sonnei</i> .
<i>Salmonella spp.</i>	Causa común en brotes de origen alimentario.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Favorecido por contacto con pollos. En México predomina en época de lluvia, la tercera parte es sintomática, y predomina en los menores de 1 año que presentan diarrea invasiva.
<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrea altamente deshidratante, común en época de calor. Varios años sin reportarse en México, último brote en 1991. (12)
<i>Clostridium botulinum</i>	Parálisis flácida. (14)
<i>Staphylococcus aureus</i> (enterotoxina b)	Vómito y diarrea.
<i>Bacillus cereus</i> (toxina emética)	Vómito y diarrea. (13)
<i>Yersinia enterocolítica</i>	Gastroenteritis aguda, enterocolitis, linfadenitis mesentérica e ileítis terminal.
<i>Aeromonas</i>	Patógeno entérico presente en hospedero sano que se asocia usualmente con diarreas ligeras, aunque a veces se manifiesta con diarreas crónicas, casi siempre son diarreas autolimitadas. (15)
Rotavirus	Virus más común en la edad infantil. Predomina en época invernal.

Candidatos

La mayoría de las diarreas leves no requieren de estudios de laboratorio para establecer su etiología. Los coprocultivos deben realizarse en casos de fiebre elevada, presencia de moco o sangre, diarrea moderada/grave o diarrea persistente cuando los datos clínicos orientan hacia un síndrome diarreico infeccioso este permite asegurar un diagnóstico eficaz y completo (12,13).

Toma de Muestra

- Evacuación

La muestra se recolecta en un recipiente copropack o en un frasco limpio estéril, de boca ancha y tapa hermética y no deben estar contaminada con orina. El volumen adecuado deberá ser del tamaño similar al de una nuez deben ser procesadas en un tiempo no mayor a 24 horas siguientes a su recolección. (6,9)

- Con Hisopo rectal

El hisopo debe humedecerse en un líquido estéril (no usar agentes lubricantes). El hisopo se inserta a través del esfínter rectal y se hace girar, retirar y observar si se ha obtenido material fecal (el hisopo debe quedar manchado). Si no se procesa de inmediato, colocar en medio de transporte a temperatura ambiente. (6,9)

En el caso de sospecha de infección por bacterias enteroinvasivas como *Campylobacter* y *Shigella*, es preferible obtener la muestra con hisopo rectal raspando la mucosa intestinal, siendo muy importante procesar la muestra de inmediato. En caso de fiebre tifoidea el coprocultivo empieza a ser positivo al final de la primera semana en un 35 a 48 % y en un 80 % después de la segunda semana de evolución. (6,9)

Procedimiento

- Sembrar en un medio de baja selectividad como MC y/o EMB y en otro de selectividad media como agar EH, VB SS o XLD. Distribuir el inóculo por el método de estría cruzada. Incubar de 18 a 24 horas a 37 °C.
- Inocular en algún medio selectivo para *Campylobacter* (Skirrow, Campy BAP AS o Butzler AS). Incubar 42 °C en atmósfera de 8-10 % de CO₂ durante 48 horas. Después de este tiempo las colonias sospechosas son comúnmente grises y de apariencia húmeda.
- El hisopo con que se inocularon las cajas anteriores se coloca en un tubo con 10 mL de un medio de enriquecimiento (Caldo Tetraciónato modificado de Kauffman adicionado de 0.2 mL de solución yodo yoduro o Caldo Selenito) e Incubar de 12 a 18 horas a 37 °C. Después de ese tiempo resembrar las placas de VB y SS o Sulfito Bismuto e Incubar de 18 a 24 horas a 37 °C.
- Leer las placas tanto de aislamiento primario como de la resiembra de caldo tetraciónato para seleccionar las colonias Lactosa Negativas sugestivas de *Salmonella*, *Shigella* o *Yersinia* y realizar pruebas Bioquímicas (Las que el bacteriólogo considere necesarias, para lograr la identificación del microorganismo. Si las colonias son Lactosa Positivas sospechosas de patogenicidad como algunas cepas de *Escherichia coli*, proceder de la misma forma.

- Si las pruebas bioquímicas orientan hacia *Salmonella* o *Shigella* realizar identificación serológica a ambas especies de Kligler o TSI con lo antisueros correspondientes.
- Si orienta a *Salmonella typhi*, utilizar el antisuero somático D o Factor 9 y el antisuero Vi.
- Si sospecha de *Escherichia coli*, del tubo del tubo de kligler o TSI realizar pruebas serológicas y de ser positivas enviar a Laboratorio de Referencia para pruebas de patogenicidad.
- Si se sospecha de *Yersinia enterocolítica* debe introducirse en la serie de pruebas Caldo Urea. Tanto *Yersinia enterocolítica* como *Yersinia pseudotuberculosis* son móviles a 22 °C e inmóviles a 37 °C.
- *Campylobacter* es un bacilo Gram Negativo, curvo, pequeño y fino que comunmente se agrupa formando aves en vuelo. (6)

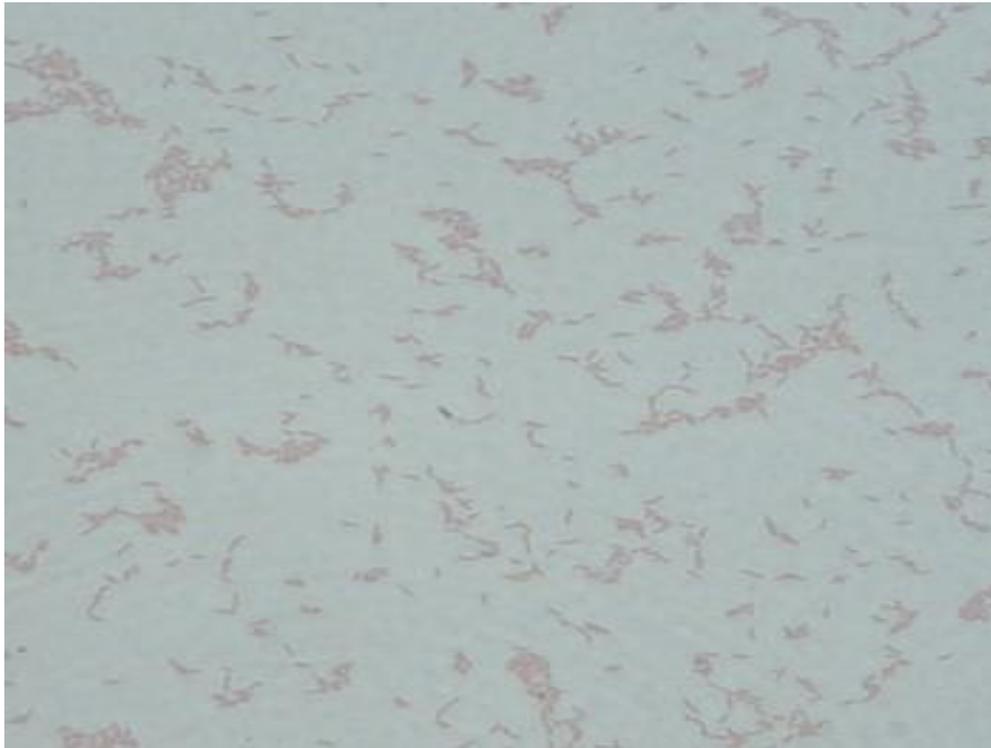


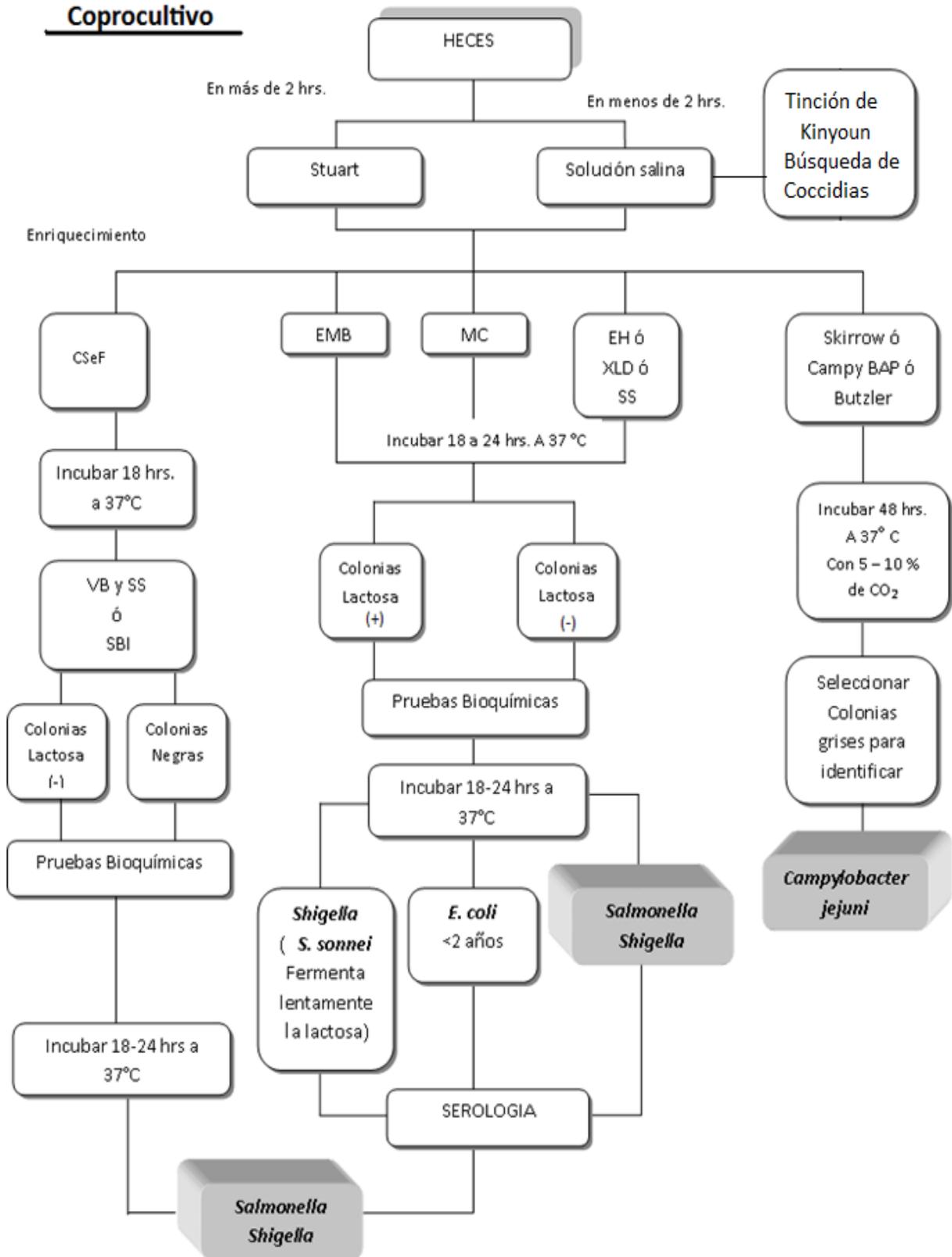
Figura 4. Tinción de Gram de *Campylobacter*; Fuente: www.nlm.nih.gov

Identificación presuntiva rápida de *Campylobacter jejuni*.



**** Es necesario dar más tiempo con la safranina para que su morfología sea más clara.**

Coprocultivo



REACCIONES BIOQUIMICAS EN ENTEROBACTERIAS

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	Otras <i>Shigella</i>	<i>Edwardsiella ictalidis</i>	<i>Salmonella TYPICA</i>	<i>Salmonella typhi</i>	Arizona	C. freundii	C. diversus	C. anthonatis	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. sakazaki</i>	<i>E. gergovias</i>	<i>E. hafnia alvaxi</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. rubiflava</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. pestis</i>	
INDOL	+		v	+		-		-	+	+		+			v	v						+		+	+	+	+	v	-	-	
ROJO DE FENOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v			v	v	v	v	v	v	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
VÓGES-Proskauer											+	+	+	+	v	+	+	v	+	v	+	+	v					v	-	-	
CITRATO DE SIMMONS					v		+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	v	+	+	(v)	v	(v)		+	+	+	-	-	-	
H ₂ S (TSI)				+	+	(+)	+															+	+								
UREA					-		-	V(W)	V(W)	v	+	+	V(W)		V(W)		+		V(W)	V(W)	V(W)	+	v	+	+	-	v	+	+	-	
CIANURO							+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+		+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	
MOVILIDAD	v			+	+	+	+	+	+	+			+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v	v	v	
GELATINA							(+)			v			v	v	v				(v)	+	(v)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DESCARBOX. LISINA	v	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+			(v)	+	(v)	(v)	(v)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ARGININA	v	-	v	-	(v)	-	(v)	(v)	(v)	(++)			+	V(W)		+		v	-	(v)	(v)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DESCARBOX. ORNITINA		+	-	+	+		+	v	+	+	-	-	+	+		+	+	+	+	+		-	+	+	+	+	+	+	+	+	
DESAMINASA			-		-	-	-	-	-	-	-	-	+		v	v				-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
MALONATO							+	v	+		+	+	v	v	v	v	+	v			v										
GAS	+		b	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	v	v	v	v	+	v	v	v	-	-	-	-	
LACTOSA	+	d					v	(v)	v	v	+	+	(v)	+	v	+	v	v		v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SACAROSA	v	d					v	v	v	v	+	+	+	+	v	+	+	v	+	+	+	+	+	v		v	v	v	+	-	
D-MANITOL	+	+	v	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	v	+	+	
DULCITOL	v		v	-	v	-	v	v	+	+	v	v	v		v																
SALICINA	v						v	(v)	(+)	+	+	(v)	+	v	+	+	v	+	+	(v)	v	v	v	-	v	-		v	+	+	
ADONITOL								+			v	v	v	+					v	v	(v)				+	+					
(MESO)-					v						+	+	v	-	v	v	v		v	(v)	v				+	-	+	(v)	-	-	
D-SORBITOL	v		v	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	v				+	+	+	+	+					+	+	v	
L-ARABINOSA	+	+	v	v	(+C)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		-	-	-	-	-	+	(v)	+	
RAFINOZA	v	d	v	-	-	-	v				+	+	(+)	+	v	+	+			+	+										
L-RAMNOSA	v	(+)	v	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	(v)	+	+	+		(v)		-	-	-	v	-	-	-	+	-	

+ – 90% son positivos en 48hrs. (+) – del 10 al 90% son positivos en 48hrs.
 v = 10% son positivos en 40 hrs. (v) = el 90% son positivas entre 3 y 7 días
 W = el 50% son positivas en 48 hrs. y el 90% son positivas de 3 a 7 días
 b – muchas cepas de *S. sonnei* dan reacciones relativamente positivas de lactosa (88%) y sacarosa (85%)
 C = algunos serotipos de *S. flexnerii* producen gas de glucosa

Tabla 4. Reacciones Bioquímicas para Enterobacterias; Fuente: Álvarez Et al, “Manual de enterobacterias” IMSS, México.

INFORME

- Salmonella typhi*
 - Salmonella spp*
 - Shigella dysenteriae*
 - Shigella flexneri*
 - Yersinia Enterocolítica*
 - Coccidias (*Isospora belli*, *Cryptosporidium sp* y *Cyclospora cayetanensis*
 - Sin Desarrollo de Bacterias Enteropatógenas
- Shigella boydii*
 - Shigella sonnei*
 - Campylobacter jejuni*
 - Yersinia Enterocolítica*
 - Escherichia coli Enteropatógena*

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente		
Nombre: Rodrigo González Rodríguez		
HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 		
Folio: 16030024	Edad: 5 años	Sexo: M
Fecha de Recibido: 16/03/11		
COPROCULTIVO		
Tipo de Muestra: Heces		
Características de la muestra: Se recibe muestra color café verdosa, consistencia Blanda.		
Gram: Bacilos Gram negativos		
Identificación: <i>Salmonella typhi</i>		
Antibiograma: Amikacina R Ceftriaxona S Norfloxacin S Ampicilina R Gentamicina S Ceftazidima S Cefalotina R Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Cefepime S		
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11	Elaboró: QFB Esperanza Reyes	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Meza

Vibrio cholerae

El cólera es una infección intestinal aguda causada por el *Vibrio cholerae*, y se caracteriza por la aparición brusca de diarrea abundante, vómitos, deshidratación e, incluso, colapso circulatorio; no recibir atención inmediata, puede llevar a la muerte en pocas horas. El primer caso mexicano de la actual pandemia se notificó en junio de 1991, en el Estado de México. Desde entonces y hasta el 31 de diciembre de 1998, se confirmaron 45 963 casos en todo el país, con 552 defunciones (1.2%); del total de casos, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) atendió 22 418 (49%) y notificó 269 defunciones (1.2%). La enfermedad se presenta por casos importados, en casos aislados, como de lenta evolución o como epidemia explosiva. Aunque se han descrito más de 60 serogrupos de *Vibrio cholerae*, sólo el 01 ocasiona la enfermedad; en el continente americano, en particular, el biotipo, Tor es el que predomina. El serotipo Inaba destacó por su frecuencia durante los primeros años, pero fue rápidamente remplazado por el Ogawa tanto en nuestro país como en el resto de América Latina, el cual ha sido aislado en la mayoría de los casos que se ha presentado últimamente.

El cuadro clínico puede variar, pues bien pueden presentarse casos asintomáticos o con diarrea leve, al igual que pacientes con la forma más grave de la enfermedad, es decir, con falta de apetito, malestar abdominal, abundante diarrea líquida (que se torna blanquecina y semeja agua de arroz), vómitos frecuentes, fiebre baja o casi inexistente, y espasmos abdominales y musculares. La deshidratación es la complicación más frecuente y grave, por lo que el tratamiento debe basarse en la reposición de líquidos, aunada al empleo de doxiciclina para disminuir la duración y el volumen de la diarrea, así como el tiempo de excreción de la bacteria (17).

El *Vibrio cholerae*, es un bacilo Gram negativo, anaerobio, en forma de de coma, móvil que produce indofenol, oxidasa y catalasa, fermenta la glucosa sin producción de gas y da francamente la prueba de String (hilo). Puede desarrollarse en varios medios, pero el que se aconseja como medio selectivo es el TCBS de preferencia recientemente preparado, ya que se ha observado que después de 24 horas pierde sensibilidad (6).

El *Vibrio cholerae* 01 presenta dos biotipos, el Clásico y El Tor, que pueden diferenciarse por varias características que a su vez los dividen en tres serotipos: el Inaba, Ogawa, e Hikojima, siendo éste último el menos frecuente y el más inestable. La enterotoxina, que es termolábil, sobrevive fuera del organismo hasta siete días, en ambiente húmedo y templado. En el agua puede sobrevivir desde unas cuantas horas hasta varias semanas, dependiendo del grado de contaminación orgánica y si el pH oscila entre 6 y 9.

Candidatos

En el caso de *Vibrio cholerae*, su búsqueda debe ser orientada y solicitada por el médico.

Toma de Muestra

Debe ser en medio Cary Blair, la viabilidad de *Vibrio cholerae* es de 4 semanas (No refrigerar). Las especificaciones para la toma de muestra son las mismas que se mencionas para coprocultivo.

Procedimiento

- Sembrar en medio TCBS y distribuir el inóculo por el método de estría cruzada e incubar de 18 a 24 horas a 37 C. El hisopo con que se inóculó el TCBS colocarlo en un tubo con Agua peptonada pH 9.0 para enriquecer. Incubar de 6 a 8 horas a 37 C. Transcurrido este tiempo resembrar a placas de TCBS, e incubar de 18 a 24 horas a 37 C.
- Identificar colonias amarillas con centro verde y efectuar pruebas bioquímicas.
- Si sugiere *Vibrio cholerae* a partir del tubo de Kligler o TSI realizar prueba de oxidasa, tinción de Gram, prueba de String (hilo) e identificación serológica.

Prueba de String (hilo)

Sobre un portaobjetos suspender un inóculo del cultivo en Kligler o TSI en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5 %. Cuando la reacción es positiva (como en el caso de *Vibrio cholerae*), la suspensión adquiere una consistencia mucoide de tal manera que al levantar la suspensión con el asa se forma un hilo mucoide con aspecto de rosario. Algunas cepas de *Aeromonas* muestran una reacción leve o retardada (6).

INFORME

Vibrio cholerae 01

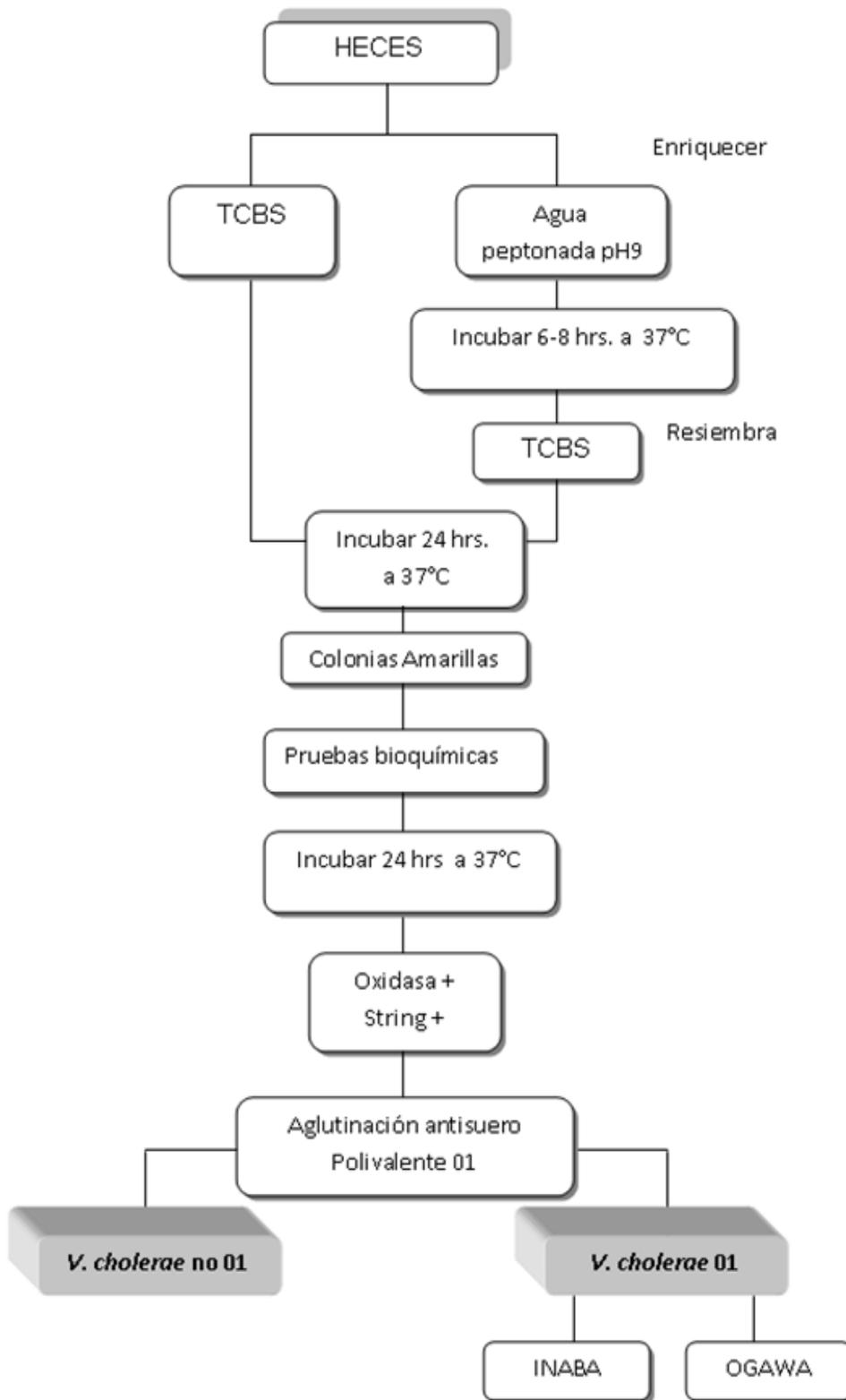
Vibrio cholerae 01 serotipo Inaba

Vibrio cholerae 01 serotipo Ogawa

Vibrio cholerae no 01

Confirmados por serología

Cultivo e Identificación de *Vibrio cholerae*



4.5. Cultivo de exudado Faríngeo y Nasofaríngeo

La faringoamigdalitis aguda corresponde a la infección de la orofaringe o nasofaringe y constituye una de las principales causas de consulta médica en la atención primaria, se caracteriza por garganta roja de más de cinco días de duración, afecta a ambos sexos y a todas las edades pero es mucho más frecuente en la infancia. (19)

Epidemiología

El diagnóstico de la faringoamigdalitis aguda es clínico. Un 90% de los casos de faringoamigdalitis aguda en adultos es de etiología viral los síntomas son odinofagia, tos, coriza, conjuntivitis y úlceras faríngeas. Los casos ocasionados por bacterias se caracterizan por la presencia de fiebre, odinofagia, adenopatía cervical anterior, exudado purulento y ausencia de tos. (20)

Tabla 5. Etiología de agentes patógenos en Faríngeo y Nasofaríngeo.

PATÓGENO	RELEVANCIA
<i>Streptococcus</i> del grupo A	La principal causa de faringoamigdalitis en fiebre reumática y portadores.(19)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Causante de Neumonía, en particular en ancianos y lactantes; causa frecuente de meningitis bacteriana, otitis media y Sinusitis.
<i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Patógeno importante, en especial en la población pediátrica, es una de las principales causas de meningitis y de casos severos de infecciones del tracto respiratorio bajo.(21)
<i>Neisseria meningitidis</i>	La enfermedad meningocócica, se puede manifestar clínicamente no sólo como meningitis, sino con cuadros fulminantes de meningococemia.(22)
<i>Bordetella pertussis</i>	Tos ferina, enfermedad respiratoria asociada a golpes de tos paroxística junto con otras complicaciones.
<i>Candida albicans</i>	Oportunista: Candidiasis, Muguet, placas de levaduras en cavidad oral.
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria, Infecciones cutáneas.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecciones cutáneas con formación de pus: furúnculos, neumonía secundaria.(16)
<i>Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae</i>	Bronconeumonía. (19)
Bacilos Gram negativos	Neumonía nosocomial.

Toma de muestra de Exudado Faríngeo

Se pide al paciente que se sienta y coloque su cabeza hacia atrás. Se ilumina bien la cavidad orofaríngea y con un abatelenguas se empuja la lengua hacia abajo para facilitar el acceso a la parte posterior de la faringe. Con un hisopo de algodón se hace un raspado de las áreas hiperémicas, purulentas o necróticas.

Toma de muestra de Exudado Faríngeo

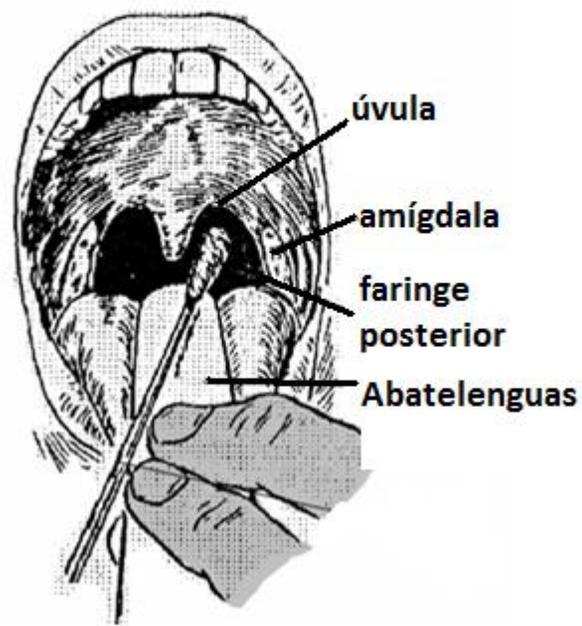


Figura 5. Toma de Muestra de exudado faríngeo.

Fuente: www.educa.madrid.org/web/ies.alpajes

Exudado Nasal

Se pide al paciente que se sienta y coloque su cabeza hacia atrás. Se introduce un hisopo flexible por una fosa nasal hasta la pared posterior de la nasofaringe.

- En caso de sospechar de *Bordetella* se introduce un hisopo de alginato de calcio, dacrón o nylon.
Los hisopos se colocan en medio de transporte Stuart. (6,26)

Toma de muestra

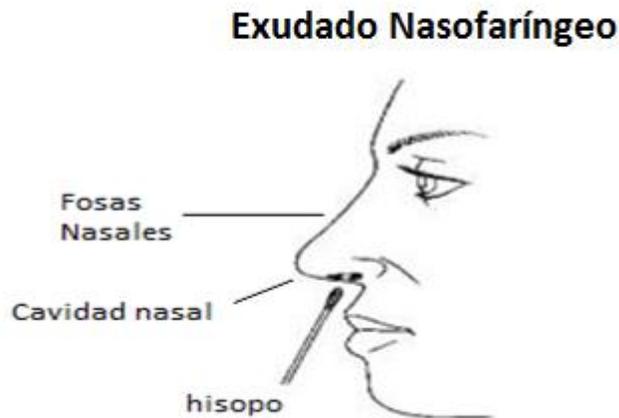


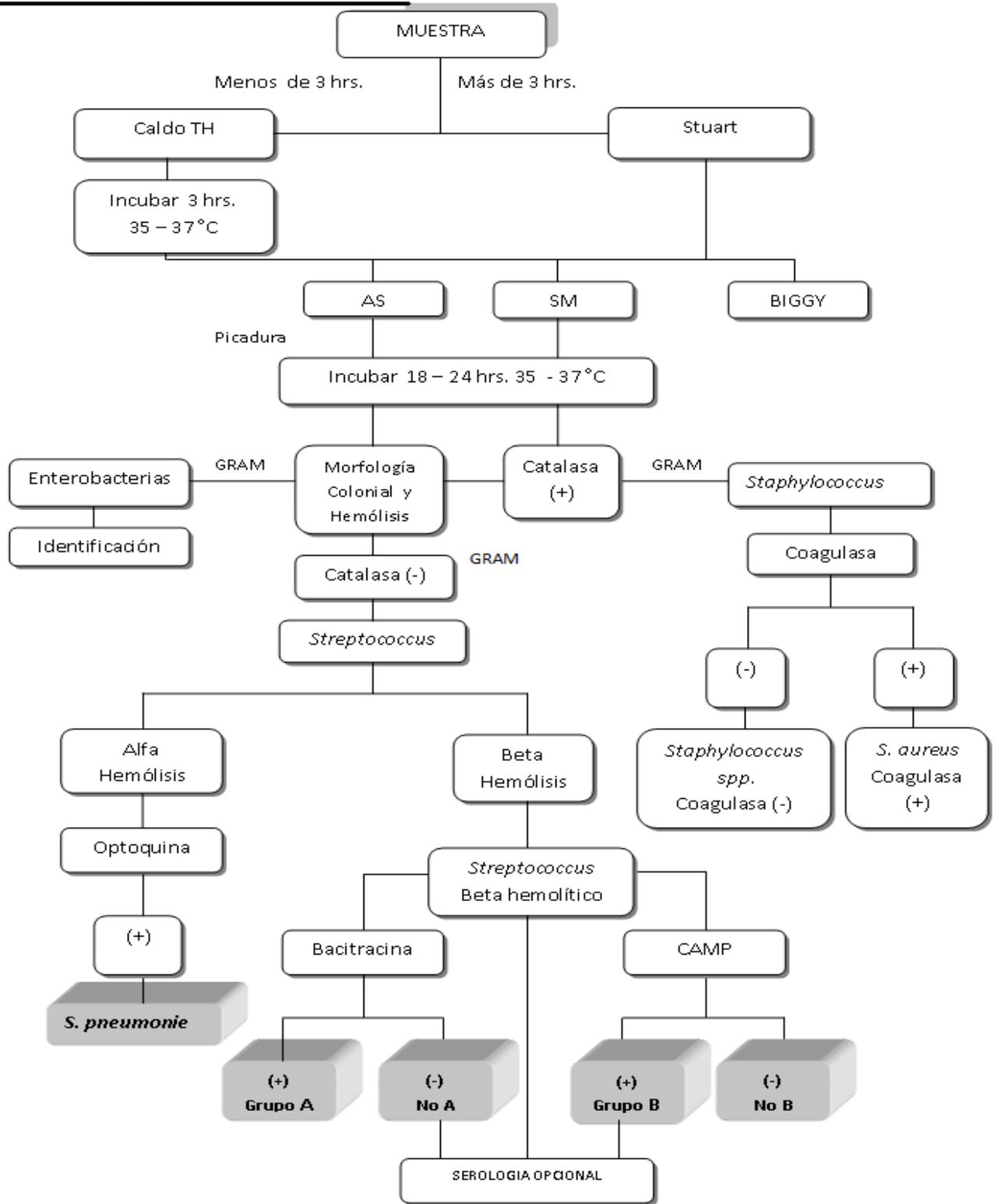
Figura 6. Toma de Muestra de exudado nasofaríngeo

Fuente: <http://www.monografias.com/trabajos/mmbiologia/mmbiologia.shtml>

Procedimiento

- Transportar en caldo TH menos de 3 horas o Medio de Stuart más de 3 horas.
- Resembrar en AS y SM aislando por estría cruzada, realizando picadura profunda en el inculo de AS incubar a 35 a 37°C Durante 18 a 24 horas.
- Revisar las placas AS contra la luz para observar morfología colonial y tipo de hemolisis.
- Realizar Prueba de Bacitracina, para *Streptococcus* Beta hemolítico grupo A.
- Realizar Prueba de CAMP, Positiva para *Streptococcus* Beta hemolítico grupo B.
Se puede confirmar también con la prueba de Hidrólisis del Hipurato.
- Realizar Prueba de Optoquina, para las colonias alfa hemolíticas y sugestivas de neumococo, es positiva para *Streptococcus pneumoniae*.
- Si hay desarrollo de estafilococo en la placa de SM se realiza prueba de catalasa y coagulasa, positivas para *Staphylococcus aureus*. (26)

Exudado Faríngeo y Nasofaríngeo



INFORME

Streptococcus Beta Hemolítico grupo A
Streptococcus Beta Hemolítico grupo B
Streptococcus Beta Hemolítico no grupo A y no grupo B
Streptococcus pneumoniae
Staphylococcus aureus
Klebsiella pneumoniae
Moraxella catarrhalis
 Flora No patógena

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			
Nombre: Fernando Zamora Cruz			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Folio: 16030030	Edad: 8 años	Sexo: M	
CULTIVO DE EXUDADO FARÍNGEO			
Tipo de Muestra: Exudado faríngeo			
Gram: Cocos Gram positivos			
Identificación: <i>Streptococcus</i> Beta hemolítico grupo A			
Antibiograma: Penicilina R Ceftriaxona S Clindamicina S Ampicilina R Gentamicina S Cefotaxima S Vancomicina R Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Trimetroprim - sulfametoxazol R			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11		Elaboró: QFB Esperanza Reyes	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Meza

4.6. Cultivo de Esputo

Los pasos previos a la infección del tracto respiratorio inferior (TRI) son el cambio cualitativo de la microbiota normal de la orofaringe (especies más invasivas o resistentes), cuantitativo (incremento de las bacterias colonizadoras) o una combinación de ambos. Los factores que propician la dinámica de las poblaciones bacterianas de la microbiota del tracto respiratorio superior (TRS) son la propia patología y el medio ambiente que rodea al paciente. Así, en los pacientes entubados y en los hospitalizados con tratamiento antibiótico se produce una drástica sustitución de los organismos Gram positivos de la microbiota orofaríngea normal, por microorganismos Gram negativos.

Los cambios en la microbiota orofaríngea conducen a la selección de diferentes microorganismos, como ocurre en los pacientes con enfermedades subyacentes, durante el tratamiento con antibióticos de amplio espectro y en pacientes con exposición a otros pacientes colonizados con microorganismos multirresistentes a los antibióticos.

La infección del TRI se produce cuando se rompe el equilibrio entre la disminución de las defensas del hospedador (inmunidad humoral, local, celular, fagocitos y mecanismos de limpieza del aparato mucociliar bronquial) y el aumento de las características de virulencia y/o tamaño del inóculo de la especie bacteriana inspirada. (27)

Epidemiología

Las infecciones bacterianas del TRI se encuentran entre los cuadros infecciosos más frecuentes y con mayores tasas de morbimortalidad, la neumonía, la bronquitis y la Tuberculosis pueden ser fatales rápidamente, depende entonces de un buen diagnóstico microbiológico el indicar un tratamiento específico. (6,27)

Tabla 6. Etiología de agentes patógenos en cultivo de esputo.

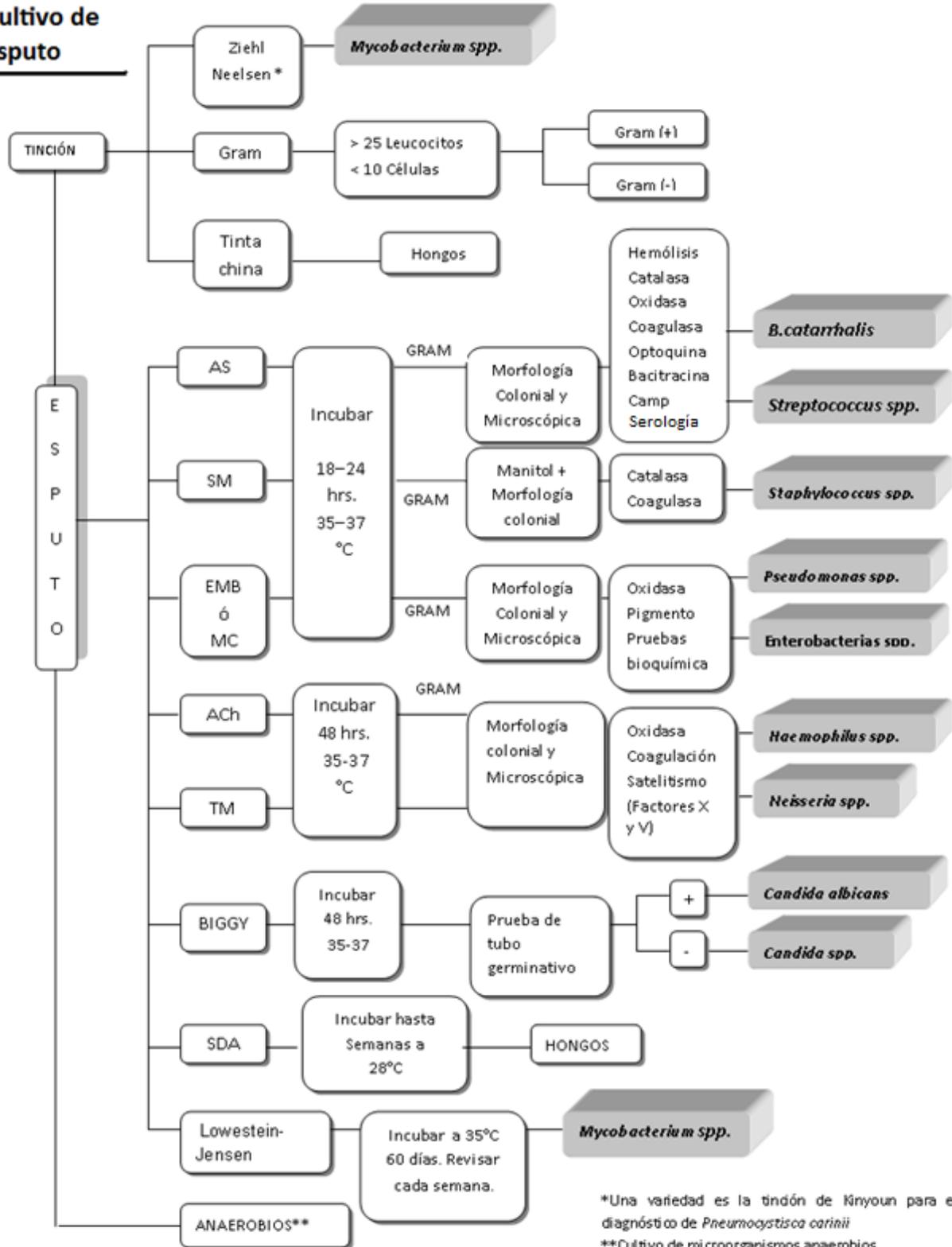
PATÓGENO	RELEVANCIA
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Neumonía
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y enterobacterias.	Neumonía nosocomial
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Bordetella pertussis</i> y <i>Bordetella parapertussis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Bronquitis, Neumonía
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis
<i>Candida albicans</i> , <i>Pneumocystis carinii</i>	Neumonía en pacientes inmunodeprimidos (6,8,24,27)

El esputo es la muestra más utilizada para el diagnóstico de infecciones del tracto respiratorio inferior, principalmente neumonía y tuberculosis. Normalmente, no es una muestra muy adecuada debido a que está contaminando con secreciones del tracto respiratorio superior y por tanto, con bacterias que colonizan la orofaringe. (4) Las muestras obtenidas por lavado bronquial o el aspirado transtraqueal son más seguras.

Toma de Muestra

- Es recomendable que la muestra sea tomada en la mañana al levantarse.
 - Haga que el paciente se enjuague la boca con agua antes de expectorar, para remover la flora superficial oral.
 - Si el paciente tiene dentadura postiza, se la debe quitar.
 - Instruya que el paciente para que tosa con fuerza y profundo, tal que obtenga un esputo que provenga del tracto respiratorio inferior.
 - Depositarlo directamente en un envase estéril. No colecte saliva ni fluido post-nasal. Hacer un frotis por Gram para confirmar la validez del esputo.
 - Para pacientes pediátricos que no pueden producir la muestra apropiada, un terapeuta respiratorio puede coleccionar la muestra por succión.
 - Si la muestra no puede ser llevada al laboratorio, puede refrigerarse no más de tres días.
- (5)

Cultivo de Espujo



Muestra Apropriada

Aplicar el criterio de Murray Washinton (1975) en Gram o la modificación de Welch Kelly (1979) en fresco, para procesar solamente las muestras que contengan más de 25 leucocitos y menos de 10 células de descamación, asegurando así que provienen de vías bajas.
(6)

INFORME

- Muestra Inadecuada por no proceder de vías respiratorias bajas.
- Microorganismo (s) aislado (s) y su sensibilidad a antimicrobianos.
- Sin Desarrollo bacteriano.

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Nombre: Karime Selene Rodríguez Mérida			
Folio: 16030015	Edad: 65 años	Sexo: M	Fecha de Recibido: 16/03/11
CULTIVO DE ESPUTO			
Tipo de Muestra: Esputo			
Criterio de Murray: Mayor a 25 Leucocitos p/c Si cumple Menor a 10 células de descamación p/c si cumple Gram: Bacilos Gram negativos Ziehl Neelsen: Negativo Tinta china: Negativo			
Identificación: <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Antibiograma: Amikacina R Ceftriaxona S Norfloxacin S Ampicilina R Gentamicina S Ceftazidima S Cefalotina R Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Cefepime S			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11	Elaboró: QFB Esperanza Reyes		Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Meza

4.7. Cultivo de Líquidos de Derrame y Secreciones

Muchos microorganismos se pueden asociar con infecciones en la piel y tejidos subcutáneos. (28) Existen enfermedades que producen acumulación de líquido en sitios estériles, cuando el cuadro clínico sugiere infección y hay derrame de líquido pleural, articular, pericardio y otros, está indicado el exudado. (6)

Epidemiología

En este tipo de infecciones el aislamiento e identificación de bacterias aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas, constituyen la mayoría de agentes etiológicos encontrados en estas lesiones. La búsqueda de anaerobios, levaduras y hongos deberá considerarse dependiendo de la información clínica sugerente. En la interpretación de los resultados de cultivo es importante diferenciar los patógenos potenciales de los microorganismos comúnmente presentes como microbiota normal o “contaminante”. (28)

Etiología

Bacterias anaerobias facultativas y aerobias causantes de infecciones en piel y tejidos blandos.

Tabla 7. Etiología de agentes patógenos en cultivo de secreciones.

PATÓGENO	RELEVANCIA
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Lesiones actinomicóticas o similares
<i>Aeromonas</i> spp.	Infección de heridas, celulitis
<i>Bacillus anthracis</i>	Antrax
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Abscesos
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria cutánea
<i>Enterobacteriaceae</i>	Heridas, quemaduras, lesiones crónicas y profundas
<i>Enterococcus</i> spp.	Heridas, quemaduras
<i>Haemophilus influenza</i>	Lesiones cutáneas asociadas con infecciones sistémicas
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis cutánea
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Lesiones cutáneas asociadas con infección sistémica
<i>Nocardia</i> spp.	Abscesos cutáneos y subcutáneos
<i>Pasteurella multocida</i>	Mordeduras animales, osteomielitis

PATÓGENO	RELEVANCIA
Microbiota normal oral	Mordeduras humanas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Heridas, quemaduras, foliculitis, forúnculos, carbunclos
<i>Pseudomonas spp.</i>	Heridas, Linfadenitis supurativa.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecciones superficiales eritematosas, infecciones profundas, foliculitis, forúnculos, carbunclos, abscesos, heridas, quemaduras catéteres Infecciones superficiales eritematosas
<i>Staphylococcus spp.</i> , coagulasa negativa	Infecciones superficiales eritematosas
<i>Streptococcus</i> del grupo A	Heridas, quemaduras
<i>Streptococcus spp.</i> beta-hemolíticos	Heridas, catéteres, mordeduras
<i>Streptococcus</i> grupo viridans	Heridas, Mionecrosis
<i>Clostridium perfringes</i>	Gangrena gaseosa (6,28)

Toma de Muestra

1. Abscesos, fistulas y heridas

- Limpie la superficie del absceso o herida con solución salina estéril o alcohol etílico al 70%.
- Si el absceso es cerrado, preferiblemente aspire con aguja la muestra de la base o de la pared de la lesión y cultive por aerobiosis y anaerobiosis.
- En caso de absceso abierto, fistula o herida, introduzca un hisopo profundamente dentro de la lesión, sin tocar el área superficial ya que puede introducir en la muestra bacterias que están colonizando la superficie y no están involucrados en el proceso infeccioso.
- No cultive lesiones secas, a menos que esté presente el exudado.
- De ser necesario, puede refrigerar la muestra hasta por una hora antes de enviar al laboratorio.
- No envíe solo pus, ya que esta no es representativa de la lesión. La base y bordes activos de la lesión son más apropiados. (5)

2. Quemaduras

- Limpiar la superficie de la quemadura de segundo y tercer grado antes de proceder a coleccionar la muestra.
- Una pequeña cantidad de tejido puede ser apropiada para el cultivo.
Si hay supuración utilice un culturette (Sistema estéril para transporte y conservación de microorganismos anaerobios y aerobios).
- Solicite cultivo aerobio solamente.

3. Úlcera de decúbito

- Limpie la superficie con agua jabonosa y solución salina estéril.
- Tome una muestra de biopsia de tejido o un aspirado con jeringa de la lesión.
- Un hisopo no es lo más recomendable para coleccionar la muestra, el tejido o aspirado es preferible en jeringa. No utilice hisopo, a menos que sea especial para el transporte de anaeróbicos. Sin embargo, cuando no es posible de otra forma, presione vigorosamente el palillo en la base de la lesión para tomar muestra.

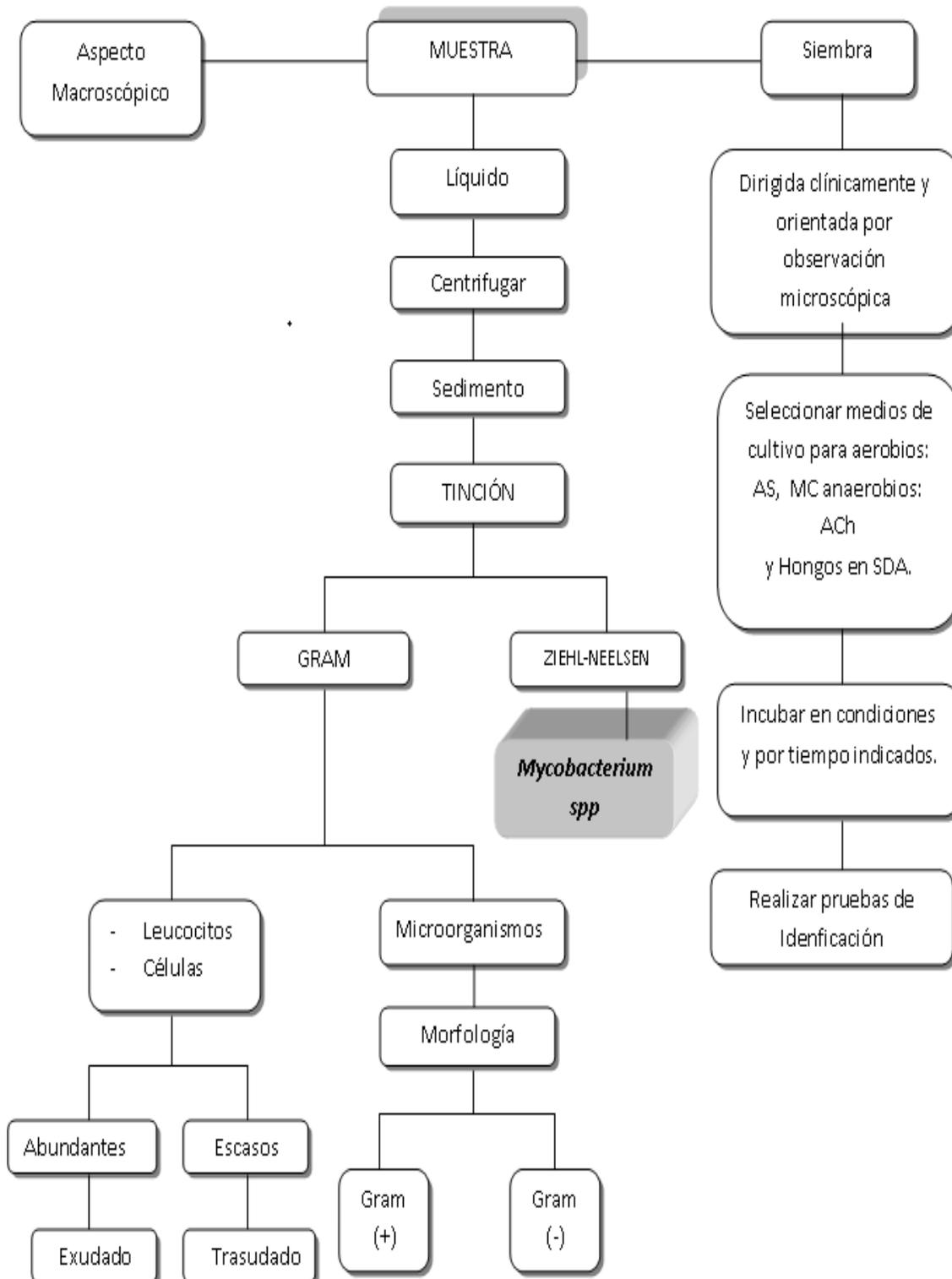
4. Líquidos Corporales: líquido peritoneal, ascítico, bilis, sinovial, pericardico, pleural, amniótico y torácico

- Desinfecte el área con tintura de yodo al 2%.
- Obtenga la muestra vía aspiración con aguja percutánea o cirugía.
- Transporte inmediatamente al laboratorio.
- Puede enviar la muestra para cultivo inoculándola en una botella para hemocultivos. Anótelos en el rotulo.
- Siempre envíe una apropiada cantidad de líquido, dependiendo de las pruebas que requiera.
- Nunca envíe la muestra en hisopo, puede ser en tubo estéril cerrado. (5)

Procedimiento

- Examen macroscópico. Observar aspecto e informarlo (serofibroso, amarillento, hemático, turbio, purulento).
- Examen Microscópico, centrifugar algunos mililitros y con el sedimento realizar tinciones de Gram, Ziehl-Neelsen.
- Si el examen directo muestra microorganismos, Realizar la siembra en AS, ACh, MC, SDA y caldo tetrionato enriquecido y en los medios seleccionados para anaerobios (Se pueden inocular en una botella de hemocultivo, como el sistema Bact Alert). Incubar en las condiciones y tiempo indicados y llevar a cabo las pruebas de identificación necesarias. (6)

Líquidos y secreciones



INFORME

Microorganismo (s) aislado (s) y su sensibilidad a antimicrobianos.
Sin desarrollo bacteriano Aerobio y anaerobio

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			
Nombre: Angel Ugalde Contreras			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Folio: 16030025	Edad: 55 años	Sexo: M	
CULTIVO DE SECRECIONES Y/O LÍQUIDOS			
Tipo de Muestra: Cultivo de Herida, postquirúrgica abdominal			
Gram: Bacilos Gram negativos			
Identificación: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Antibiograma: Amikacina R Ceftriaxona S Norfloxacin S Ampicilina R Gentamicina S Ceftazidima R Cefalotina R Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Cefepime S			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11	Elaboró: QFB Ivonne Barrera		Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Meza

4.8. Detección de biofilms (cultivo de punta de catéter)

Los biofilms son comunidades microbianas fuertemente adheridas a superficies inertes o vivas. Los biofilms están relacionados con la virulencia de la bacteria: el biofilm confiere resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero e impide la penetración efectiva de antibióticos y anticuerpos.

Epidemiología

Los agentes patógenos presentes en un biofilm representan también una fuente constante de inóculo y son responsables de émbolos sépticos hematógenos que se diseminan, lo que puede dar lugar a infecciones secundarias.

Etiología

Particularmente, tienen gran trascendencia por su capacidad de adherirse a biomateriales como, por ejemplo, los catéteres intravasculares o materiales de prótesis. El punto de inserción del catéter puede ser rápidamente colonizado por *Staphylococcus epidermidis* y otros *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, etc; poco después del contacto. (4)

Toma de Muestra.

Catéter

- Limpie la piel alrededor del catéter con alcohol etílico al 70%.
- Asépticamente remueva el catéter y corte de 3 a 5 cm. de la punta distal y colóquela en un tubo o envase estéril sin medio de cultivo.
- Transporte inmediatamente al laboratorio para prevenir su desecación.
- Catéteres Intravenosos aceptables para cultivos semicuantitativos son: Central, Hickman, Broviac, periférico, arterial, umbilical, hiperalimentación, Swan-Ganz. (5)

Procedimiento

Cultivo por Técnica de Maki

- Tomar el catéter con las pinzas estériles y hacerlo rodar en las cuatro direcciones sobre la superficie de la placa de agar sangre.
- Retirar el catéter.
- Incubar la placa a 35 °C durante 24 horas.
- Contar el número de colonias (Un recuento superior a 15 unidades formadoras de colonias (UFC) se correlaciona con una infección asociada al catéter)

Desarrollo y Detección del biofilm

- Sembrar una de las colonias aisladas en 5 mL de TSB + glucosa al 1%.
- Incubar a 35 °C durante 24 horas.
- Retirar el medio de cultivo y lavar tres veces con 5 mL de solución salina estéril.
- Añadir 5 mL de una solución de azul de tripán al 0.4 %. Rotar suavemente el tubo para favorecer una tinción uniforme.
- Retirar el colorante, invertir el tubo y dejar secar al aire.
- Observar el biofilm adherido a la superficie interna del tubo que aparecerá teñido de color azul. (4)

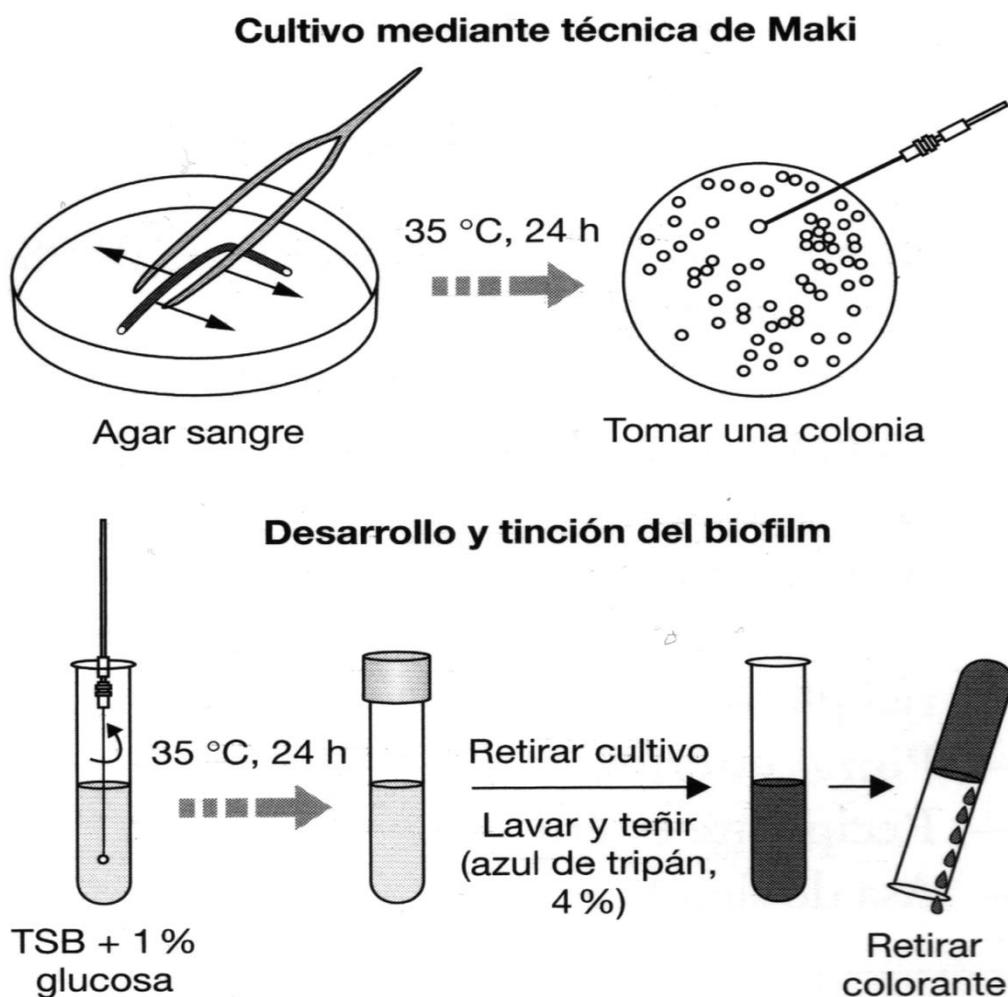


Figura 7. Cultivo mediante técnica de Maki y detección del biofilm; Fuente: Gamazo et al “Manual práctico de Microbiología” 2005.

INFORME

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus coagulasa negativo

Staphylococcus aureus

Enterococcus

Pseudomonas

Enterobacterias

Sin Desarrollo Bacteriano

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			
Nombre: Ángel Ugald e Contreras			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Folio: 16030025	Edad: 55 años	Sexo: M	
CULTIVO DE PUNTA DE CATÉTER			
Tipo de Muestra: Catéter inguinal			
Identificación: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Antibiograma:			
Penicilina	R		
Ceftriaxona	S		
Clindamicina	R		
Ampicilina	R		
Gentamicina	S		
Ceftazidima	S		
Vancomicina	S		
Ciprofloxacina	S		
Imipenem	R		
Meropenem	R		
Cefotaxima	S		
Trimetroprim - sulfametoxazol	R		
Fecha de Reporte terminado: 19/03/11	Elaboró: QFB Ivonne Barrera	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Méza	

4.9. Hemocultivo

La entrada al torrente circulatorio de una bacteria o de un hongo se produce a partir de una infección focal, que puede estar localizada en la piel, en el tracto urinario, en el pulmón, en el tubo digestivo o en otro lugar que constituye la puerta de entrada (foco de sepsis) los catéteres y otros instrumentos intravasculares colonizados también son un foco de sepsis frecuente, la bacteriemia o fungemia se establece cuando la multiplicación de los microorganismos en la sangre supera la capacidad del sistema fagocitario para eliminarlos. Suele denominarse septicemia a la invasión persistente del torrente circulatorio por bacterias u hongos que da lugar a manifestaciones clínicas de infección sistémica, como fiebre, taquicardia, leucocitos y otras. (2)

Las bacterias entran al torrente sanguíneo desde focos extravasculares, vía vasos linfáticos. La bacteremia puede ser:

- a) Transitoria: Cuando los microorganismos, a menudo de la flora normal, son introducidos a la sangre como consecuencia de procedimientos relativamente simples (cepillado de dientes, abrasiones gingivales, manipulación).
- b) Intermitente: Por liberación periódica de sitios de infección, tales como abscesos extravasculares, cavidades empiémicas, o infecciones difusas (celulitis, peritonitis, artritis séptica).
- c) Continua: Usualmente se produce en casos donde los organismos tienen acceso directo al torrente circulatorio, tales como endocarditis, fistulas arteriovenosas, catéteres intraarteriales o cánulas permanentes.(9)

Los sitios de entrada más comunes para la septicemia son tracto genitourinario (25%), tracto respiratorio (20%) y abscesos (10%), mientras que en un 35% de los casos se desconoce con exactitud la fuente de la bacteremia. Los bacilos Gram negativos, en particular los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*), *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida spp.* están presentes en más del 50% de las bacteremias. Estos microorganismos son capaces de colonizar rápida y eficazmente la piel y tracto gastrointestinal de pacientes hospitalizados, lo cual, sumado a su resistencia relativamente alta a los antimicrobianos, se convierten en un factor de riesgo importante. (28)

Etiología

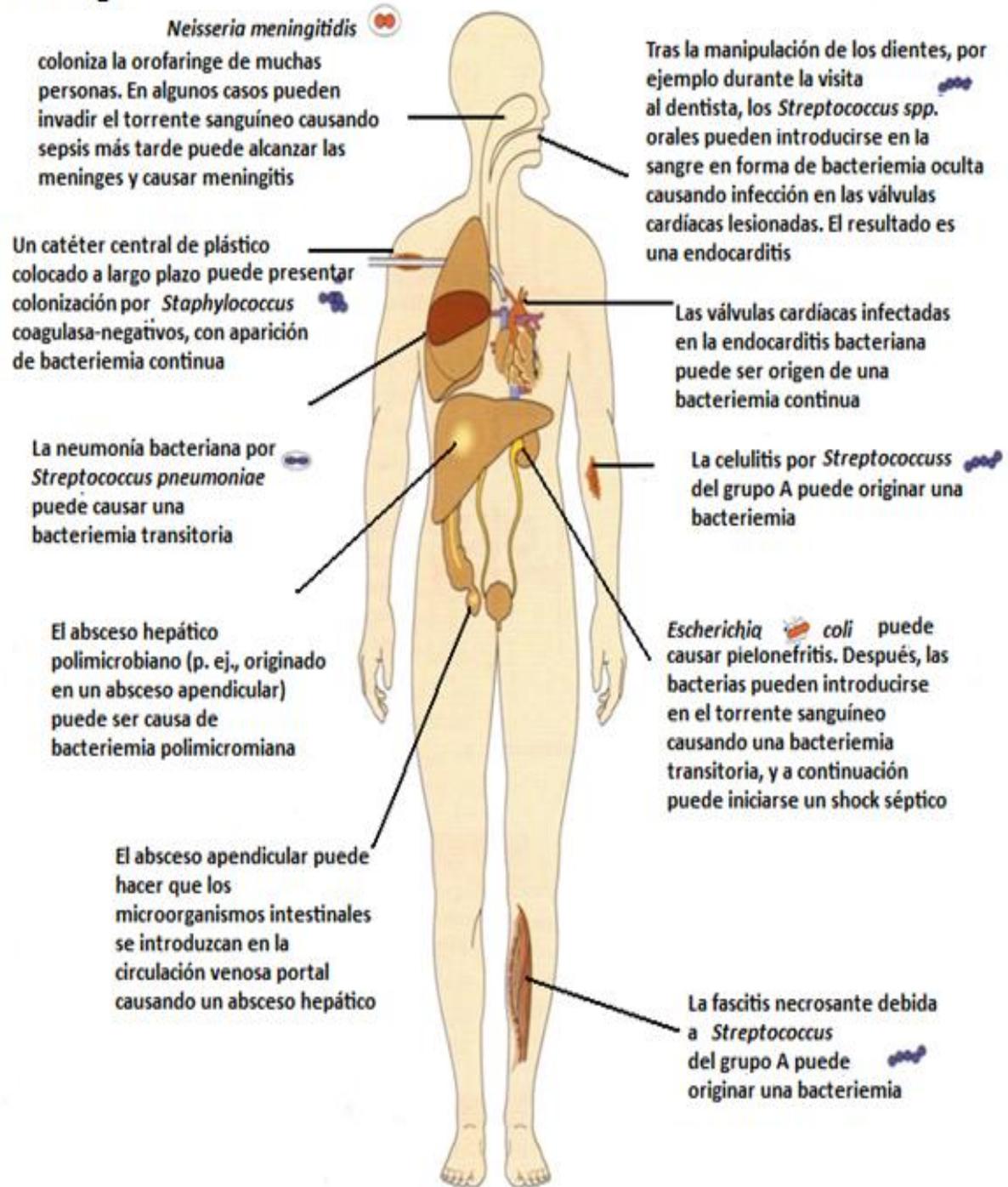


Figura 8. Ejemplos del origen de los cuadros de bacteriemia transitoria, intermitente y continua; Fuente: J.K. Struthers, R.P. Westran, "Bacteriología Clínica" 2005.

El hemocultivo es la clave en el tratamiento del paciente con bacteremia o sepsis . Lo habitual en la mayor parte de los pacientes es obtener muestras para realizar un grupo de hemocultivos, pero en el contexto de la endocarditis bacteriana deben obtenerse muestras de sangre para 3-4 grupos de hemocultivos a lo largo de un periodo de minutos u horas.

Toma de muestra Hemocultivo

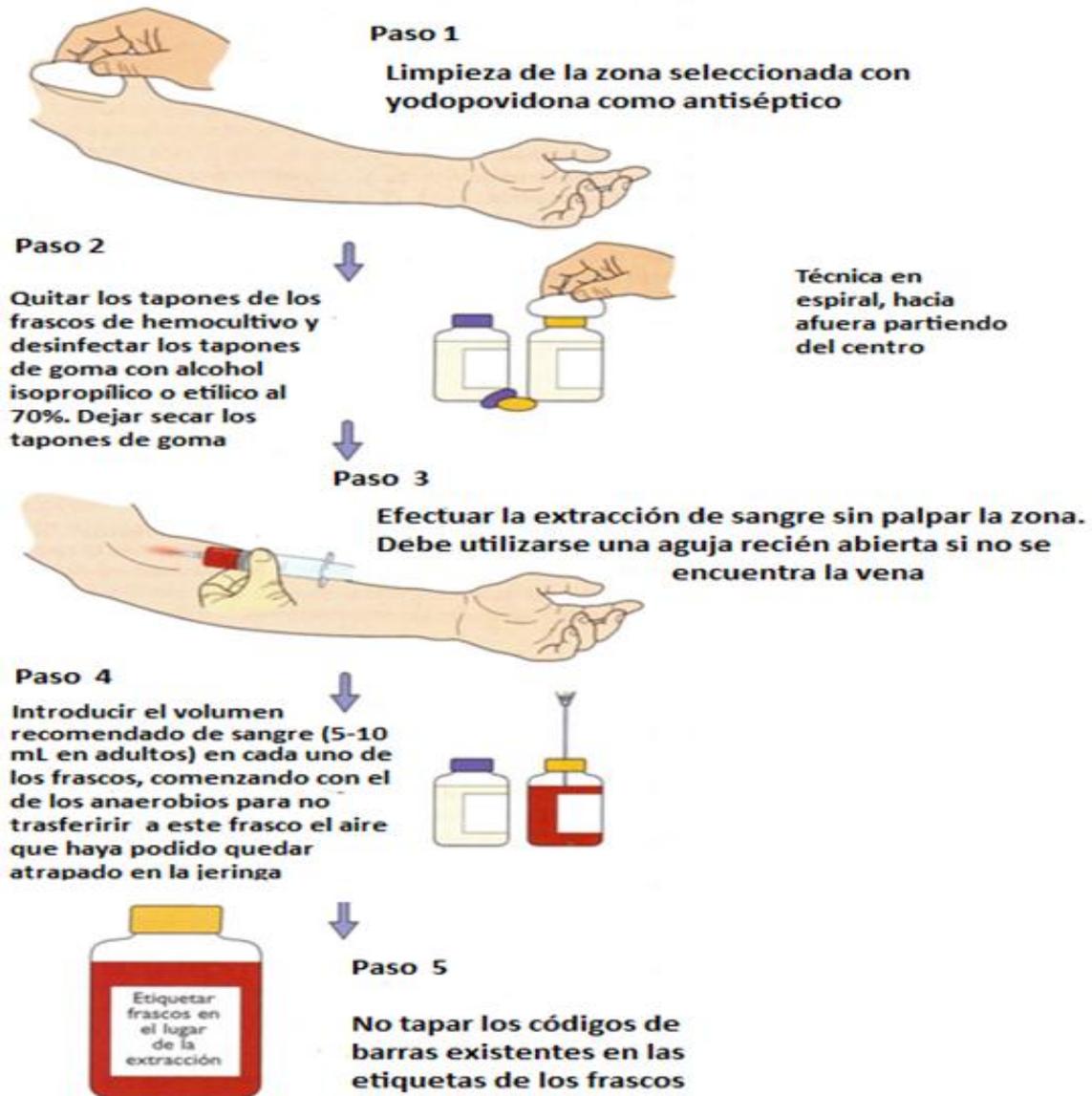


Figura 9. Técnica aséptica para la obtención de muestras de sangre para hemocultivo; Fuente: J.K. Struthers, R.P. Westran, "Bacteriología Clínica" 2005.

Procesamiento

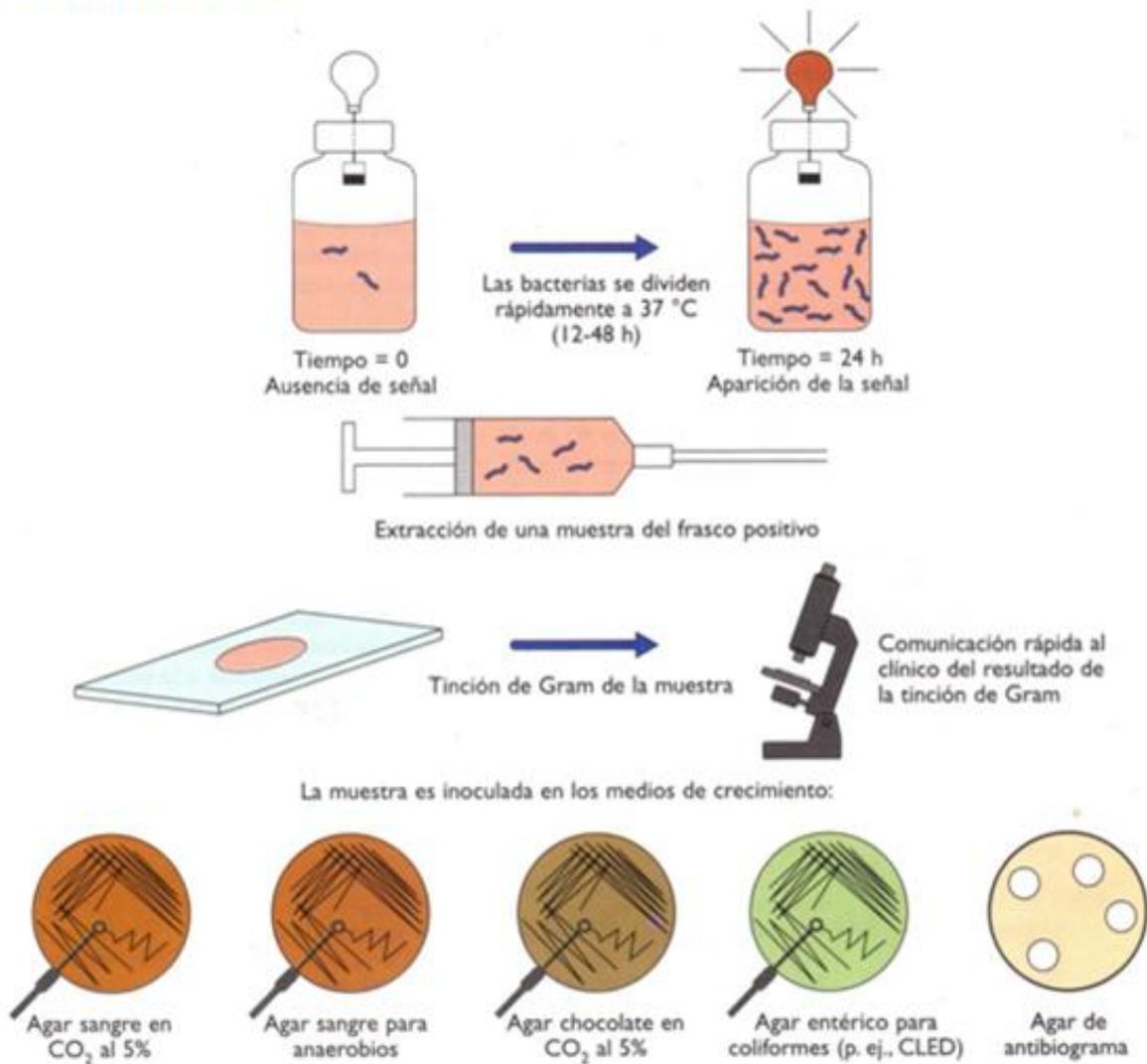
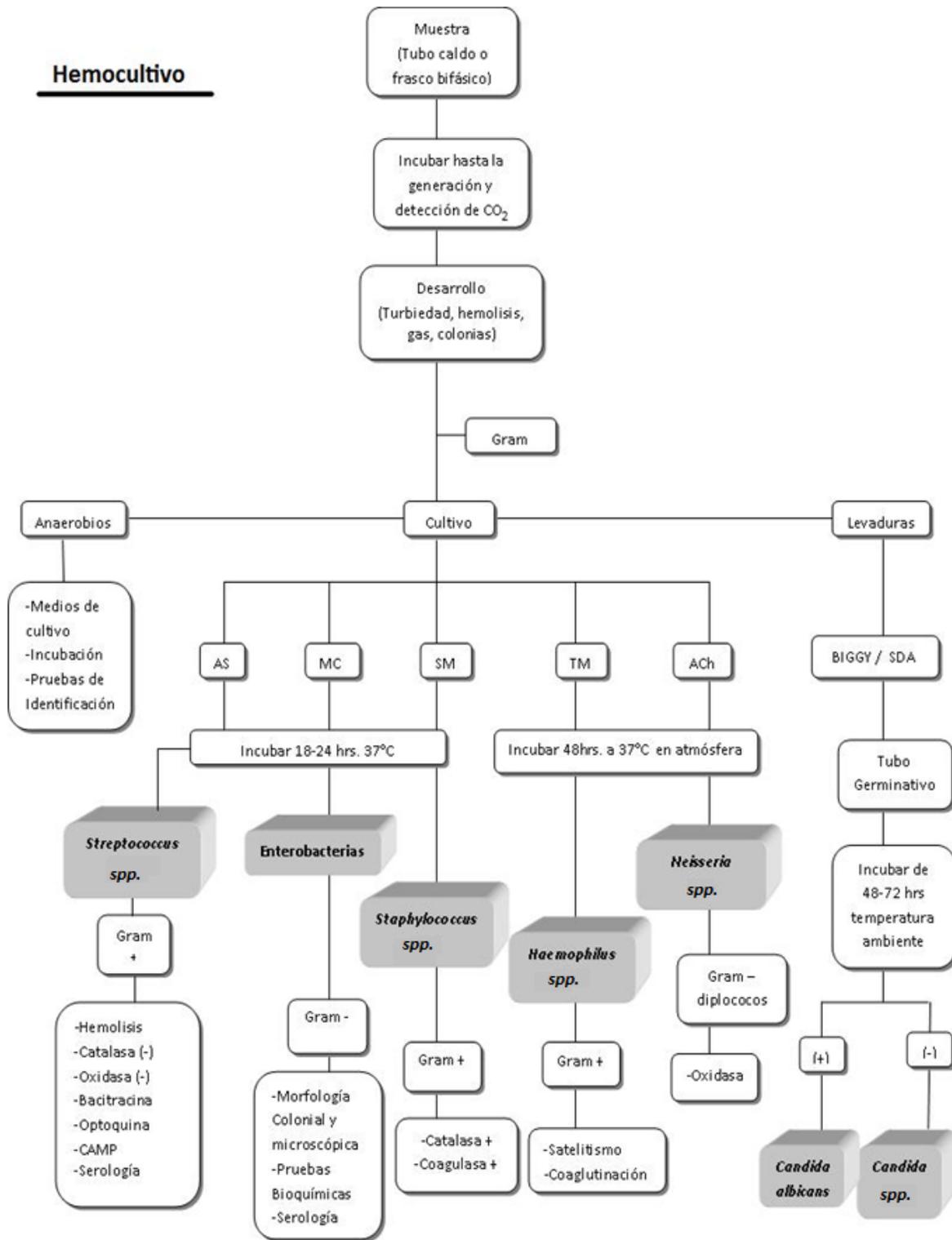


Figura 10. Inoculación de Hemocultivos positivos; Fuente: J.K. Struthers, R.P. Westran, "Bacteriología Clínica" 2005.

Los frascos de hemocultivo inoculados son incubados a 37°C para optimizar el crecimiento de las bacterias. Los frascos positivos son sacados de la máquina de hemocultivo para obtener una muestra del líquido que contienen, realizar la tinción de Gram sobre esta y extendería directamente en una placa de agar para cultivo y antibiograma.

Hemocultivo



INFORME

Positivo: Microorganismo aislado y su sensibilidad a antibióticos.

Negativo: Sin desarrollo bacteriano a los 7 días de incubación.

Negativo para *Brucella*: Sin desarrollo a los 21 días de incubación (Búsqueda específica).

Staphylococcus epidermidis, No se considera patógeno y pone de manifiesto una mala asepsia en la toma de muestra.

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			
Nombre: Luisa Méndez Solano			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Folio: 16030029	Edad: 40 años	Sexo: F	
HEMOCULTIVO			
Tipo de Muestra: Sangre, obtenida por punción en paciente que presenta pico febril.			
En caso de que la muestra sea positiva: Incubación: Desarrollo a las 72 horas __ Gram: <u>Bacilo Gram-negativo</u>			
Identificación: <i>Serratia marcescens</i>			
Antibiograma: Amikacina R Ceftriaxona S Norfloxacin S Ampicilina R Gentamicina S Ceftazidima S Cefalotina R Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Trimetoprim-sulfametoxazol S			
Fecha de Reporte terminado: 23/03/11	Elaboró: QFB Ivonne Barrera	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Meza	

4.10. Exudado Ótico

La infección del conducto auditivo externo es originada por microorganismos invasores de microbiota de piel y bacilos Gram negativos en particular *Pseudomonas*.

En el caso de la otitis externa localizada que aparece como pústulas o forúnculos asociados a folículos pilosos el responsable es *Staphylococcus aureus*. Causa frecuente de otitis externa en niños con candidiasis micro cutánea crónica es *Candida albicans*.

Generalmente la otitis externa crónica es debida a la irritación del drenaje del oído medio en pacientes con otitis media supurada crónica.

Desde el punto de vista práctico y para fines clínicos, todas las causas de otitis media y sobre todo las supuradas, son atribuidas a infección por bacterias patógenas y tratadas con antimicrobianos.

Epidemiología

Las infecciones del oído medio constituyen unos de los motivos más frecuentes de consulta pediátrica.

Etiología

La mayoría de los casos son debido a infecciones por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, en menor frecuencia a *Streptococcus pyogenes*, *Moraxella*, *Staphylococcus aureus*, bacilos Gram negativos y *Pseudomonas*. Estos últimos en recién nacidos y casos crónicos especialmente en pacientes diabéticos.

Los estudios bacteriológicos de las secreciones óticas están indicadas solo en las siguientes circunstancias:

- Presencia de síntomas generales que sugieran enfermedad grave.
- Sospecha de complicaciones como mastoiditis, meningitis o absceso cerebral.
- Paciente con inmunodeficiencia.
- Fracaso terapéutico de esquemas habituales de antibióticos.

Siendo de suma importancia el diagnóstico clínico, sitio y condiciones de toma de muestra, para orientar la investigación hacia los posibles agentes causales de la infección. (6)

Toma de muestra.

Antes de tomar la muestra proveniente de oído externo, hacer aseo cuidadoso de la piel de modo de disminuir las posibilidades de arrastrar bacterias presentes normalmente en esa zona.

- El cultivo de drenaje del oído se recolecta colocando un hisopo, con suavidad en el canal del oído, dirigir el hisopo en sentido oblicuo de atrás hacia adelante y de abajo hacia arriba.

Toma de muestra

Exudado Ótico

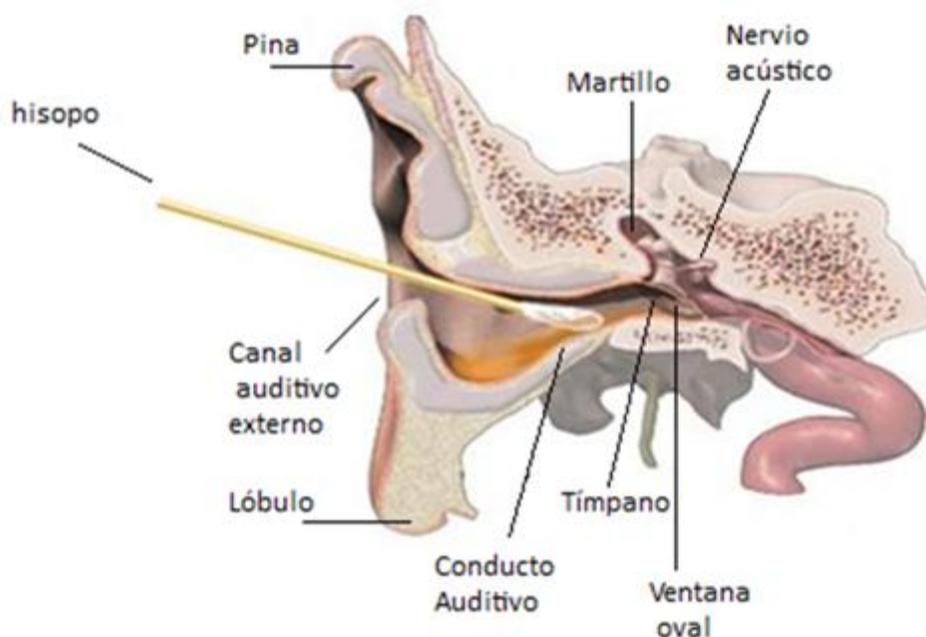
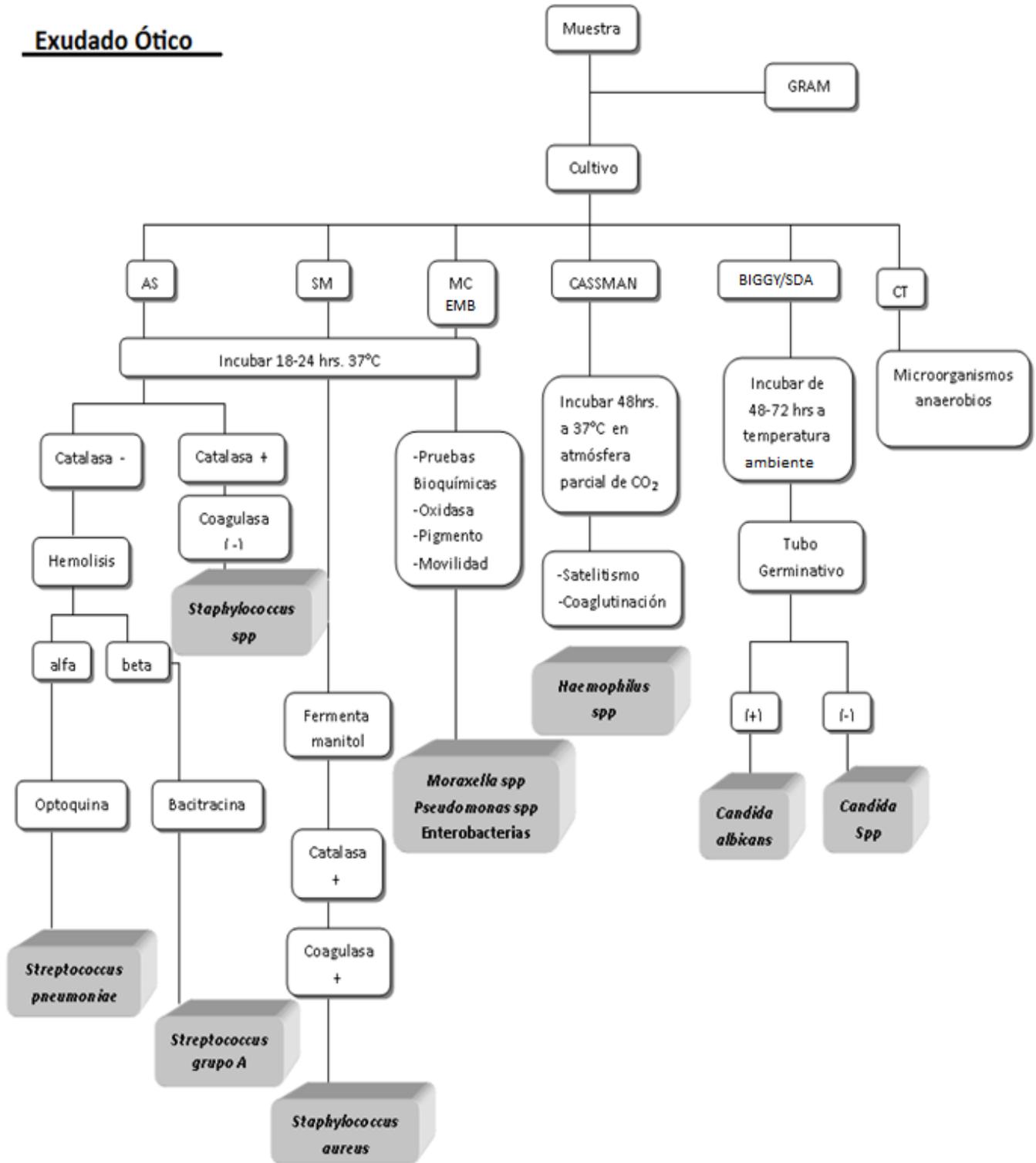


Figura 11. Toma de muestra de Exudado Ótico; Fuente: [http://www. microbiologiaseminario4.blogspot.com/](http://www.microbiologiaseminario4.blogspot.com/)

Exudado Ótico



INFORME

Informar microorganismo aislado y su patrón de sensibilidad. (6)

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			
Nombre: Miguel Rodríguez Alvarado			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Folio: 16030069	Edad: 56 años	Sexo: M	
CULTIVO DE EXUDADO ÓTICO			
Tipo de Muestra: Exudado Otico			
Gram: Cocos Gram positivos			
Identificación: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Antibiograma: Penicilina R Ceftriaxona S Clindamicina R Ampicilina R Gentamicina S Ceftazidima S Vancomicina S Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Trimetoprim - sulfametoxazol R			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11		Elaboró: QFB Esperanza Reyes	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Meza

4.11. Exudado conjuntival

El ojo rojo es el trastorno ocular que hace que los pacientes acudan con mayor frecuencia al médico. La conjuntivitis es la principal causa del ojo rojo y puede deberse a infección, alergia o irritación química.

La conjuntivitis infecciosa puede afectar a personas de cualquier edad y en la mayor parte de los casos desaparece tras la aplicación de antibióticos tópicos. La infección puede afectar a otras zonas del ojo, como la córnea y las cámaras anterior y posterior. También pueden estar implicadas estructuras como la órbita y los senos cavernosos de la proximidad de estas estructuras al cerebro, en ocasiones se asocian a cuadros potencialmente mortales. Cualquier infección del ojo o de sus estructuras asociadas, acompañada de dolor y pérdida de la visión, debe ser considerada como una urgencia que obliga a la consulta rápida al oftalmólogo.

Los procesos patológicos principales son: la conjuntivitis, la queratitis (infección de la córnea) y la endoftalmítis. El uso cada vez más frecuente de lentes de contacto y su limpieza con agua contaminada han dado lugar a cuadros de queratitis. (6)

Epidemiología

En los países en vías de desarrollo, constituida fundamentalmente por las infecciones oculares tradicionales. El tracoma es un ejemplo de ello, causado por *Chlamydia trachomatis* este afecta a 500 millones de personas, 10 millones de las cuales sufren ceguera por esta causa. (9)

En los países de Africa occidental, central y oriental, así como en diversas partes del América central, un azote de todos los tiempos ha sido la denominada ceguera de los ríos una enfermedad que afecta al menos a 20 millones de personas. Su causa es la microfilaria del parásito *Onchocerca volvulus*. Este parásito lo propaga la mosca negra *Simulium* chupadora de sangre. Este parásito en fase de microfilaria invade la cámara anterior del ojo, causando úlceras corneales y fibrosis que inducen ceguera. El organismo alcanza el ojo a través de las moscas y las manos contaminadas. (9)

Etiología

Los microorganismos que deben considerarse en las infecciones oculares se muestran en la siguiente tabla, también incluyen algunos virus que causan conjuntivitis y queratitis.

Tabla 8. Flora patógena de conjuntivitis.

Secreción	Conjuntivitis	Microorganismo
Serosa Catarral purulenta	Viral o alérgica Bacteriana aguda Parasitaria	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> del grupo A <i>Haemophilus Influenzae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Pseudomonas</i> Enterobacterias Adenovirus Herpes simple Enterovirus (71) Sarampión <i>Entamoeba spp.</i> Amibas de vida libre (AVL)
Mucopurulenta leve	Clamydial Bacteriana crónica	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Moraxella spp.</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Haemophilus</i> <i>Pseudomonas</i>
Membranosa	Difterica Streptococica	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Streptococcus B hemolítico</i>
Ligera con nódulos y ulceración	Tuberculosa	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Tabla 9. Características citológicas de Infección conjuntival.

Morfología celular	Implicación
90% polimorfonucleares	Conjuntivitis bacteriana y conjuntivitis química irritativa
Gran cantidad de eosinofilos	Conjuntivitis alérgicas
Predominio de linfocitos y monocitos	Conjuntivitis virales
Mezcla de polimorfonucleares, monocitos y linfocitos	Conjuntivitis por Herpes zoster y conjuntivitis clamidial
Células gigantes multinucleadas y cuerpos de inclusión intracelular	Conjuntivitis clamidial
Presencia de levaduras, segmentos hifales	Conjuntivitis micótica

Generalmente los procesos infecciosos oculares están dados por un solo microorganismo y los cultivos obtenidos son en forma pura aunque no abundante, sin embargo en zonas más expuestas como conjuntiva pueden presentarse infecciones mixtas. (6)

Procedimiento

Es necesaria que la toma del exudado sea procedente de los fondos de saco conjuntivales de cada ojo. Para la detección de Clamidias y de virus, el hisopo se debe colocar en un medio de transporte específico para Clamidias y para virus, respectivamente.

La búsqueda de *Chlamydia trachomatis* deberá ser indicada por el médico y la búsqueda de virus debe remitirse al laboratorio de virología, para realizar un cultivo celular en líneas celulares apropiadas.

Para amibas se recomienda un estudio microscópico en fresco.

Toma de muestra

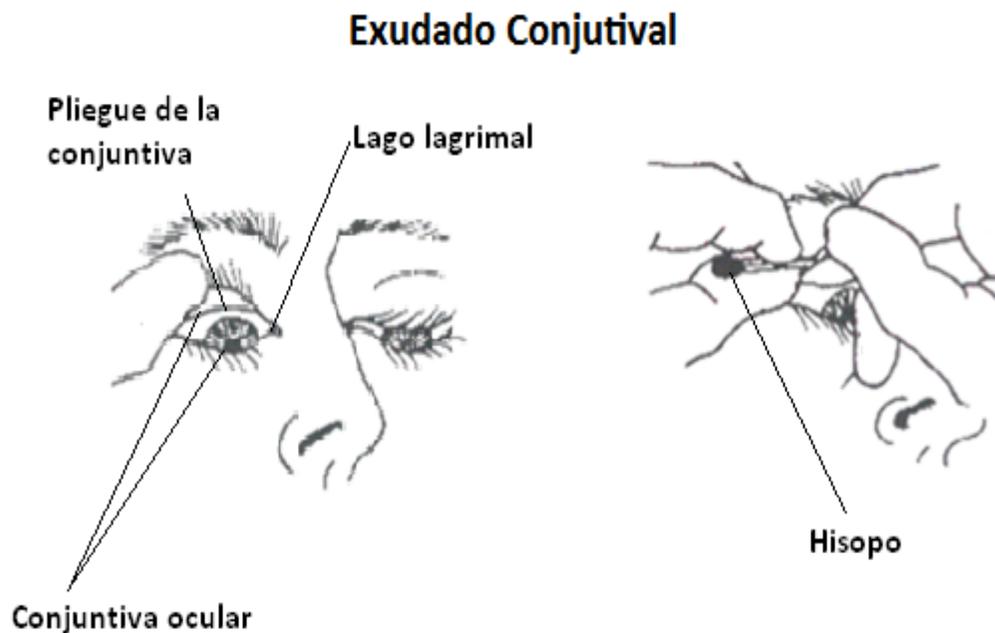


Figura 12. Toma de muestras de Exudado conjuntival; Fuente: <http://www.tecnologiahechapalabra.com/salud/enlaces/...>

INFORME

Informar microorganismo aislado y su patrón de sensibilidad. (6)

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			
Nombre: Octaviano González Rodríguez			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Folio: 16030069	Edad: 28 años	Sexo: M	
CULTIVO DE EXUDADO CONJUNTIVAL			
Tipo de Muestra: Exudado Conjuntival			
Gram: Diplococos Gram negativos			
Identificación: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>			
Antibiograma: Amikacina R Ceftriaxona S Norfloxacina S Ampicilina R Gentamicina S Ceftazidima S Cefalotina R Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Trimetoprim-sulfametoxazol S			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11		Elaboró: QFB Esperanza Reyes	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Meza

4.12. Cultivo de Líquido Cefalorraquídeo

Epidemiología

La meningitis bacteriana continúa siendo uno de los grandes problemas de la salud pública mundial. (22) La meningoencefalitis aguda es una infección de las meninges y el encéfalo potencialmente mortal, el 70% de los casos se presentan en menores de 5 años de edad. En pacientes normales, los microorganismos se limitan a unas cuantas especies bacterianas al parecer dotadas de factores de virulencia que las capacitan para invadir el sistema nervioso central. (6) Los pacientes con meningitis aguda temprana pueden experimentar un síndrome de tipo influenza y endurecimiento del cuello, dolor de cabeza, fiebre baja y letargo. La meningitis crónica o subaguda, causada por tuberculosis o infecciones fúngicas, pueden presentarse con signos de presión intracraneana aumentada (papiledema, náuseas, vómitos) y cambios mentales. (3)

El diagnóstico etiológico de una meningitis precisa el procesamiento y cultivo del LCR. La dificultad de su obtención hace del LCR una de las muestras biológicas estériles más valiosas; por tanto, la técnica de extracción y el posterior procesamiento del LCR deben ser lo más cuidadosa posible para aprovechar al máximo las posibilidades diagnósticas de la muestra. (29)

El LCR es normalmente claro como el agua, no tiene más de 5 linfocitos/ mL, tiene una concentración de glucosa de 45 a 100 mg/dL, según el nivel de glucosa en la sangre, una concentración de proteínas variable entre 14 y 45 mg/ dL. (3)

Tabla 10. Características citoquímicas de LCR en diferentes patologías.

LCR	Aspecto	Células/ mm ³	Glucosa mg/dL	Proteína mg/dL
Normal	Claro (como agua)	< 5 Linfocitos	45 – 100	14 – 45
Meningitis Aguda Bacteriana	Turbio, Purulento	500 a 20,000 Neutrófilos segmentados	< 20	200 – 500
Meningitis Tuberculosa	Agua de roca o Xantocrómica	< 1000 linfocitos	15 – 30	>500
Meningitis Viral	Agua de roca	< 500 linfocitos	Normal	< 200

Etiología

La meningitis es más prevalente en ciertos grupos etarios o en pacientes con varias enfermedades subyacentes.

Tabla 11. Etiología de agentes patógenos en Líquido Cefalorraquídeo.

Microorganismo	Prevalencia
<i>Streptococcus</i> del grupo B, <i>Escherichia coli</i> .	Mayor prevalencia de Meningitis en Neonatos, asociada con invasión directa de flora de la madre durante alumbramiento vaginal.
<i>Lysteria monocitogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , Especies de <i>Serratia</i> y <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y varias bacterias anaerobias.	Menor prevalencia de Meningitis en Neonatos.
<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	Es la causa más común de meningitis bacteriana aguda en el grupo de los 6 meses a los 5 años de vida, relacionados con bacteremia y extensión de la infección a los senos adyacentes o al oído medio
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>	Causa más común de meningitis bacteriana en Adultos.
<i>Escherichia coli</i> , bacilos Gram negativos	Prevalencia de Meningitis en la vejez.
<i>Lysteria monocitogenes</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Causan formas crónicas de meningitis en pacientes con defensas alteradas.
<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , bacilos Gram negativos, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	Meningitis postraumática o postquirúrgica
<i>Bacterias Anaerobias</i>	Meningitis por Abscesos cerebrales
Hongos: <i>Cryptococcus neoformans</i> , Especies de <i>Nocardia</i> .	Formas crónicas de meningitis en pacientes inmunodeprimidos.
Virus: <i>Enterovirus</i> y <i>Arbovirus</i>	Meningitis viral. (3)

Toma de muestra

Las muestras son obtenidas por un Médico y en condiciones estériles.

- Realizar la punción en condiciones de máxima asepsia.
- Desinfectar la zona con povidona yodada al 2%.
- Realizar la punción en los espacios intervertebrales L3-L4, L4-L5 ó L5-S1.
- Mida la presión del líquido.
- Ordene los tubos: Química, frotis, cultivo y aglutinaciones.
- Si no logra obtener el suficiente líquido, envíe lo colectado al laboratorio de microbiología primero.
- Envíe inmediatamente al laboratorio.
- Nunca refrigere el LCR. (5)

Toma de muestra

Líquido Cefalorraquídeo

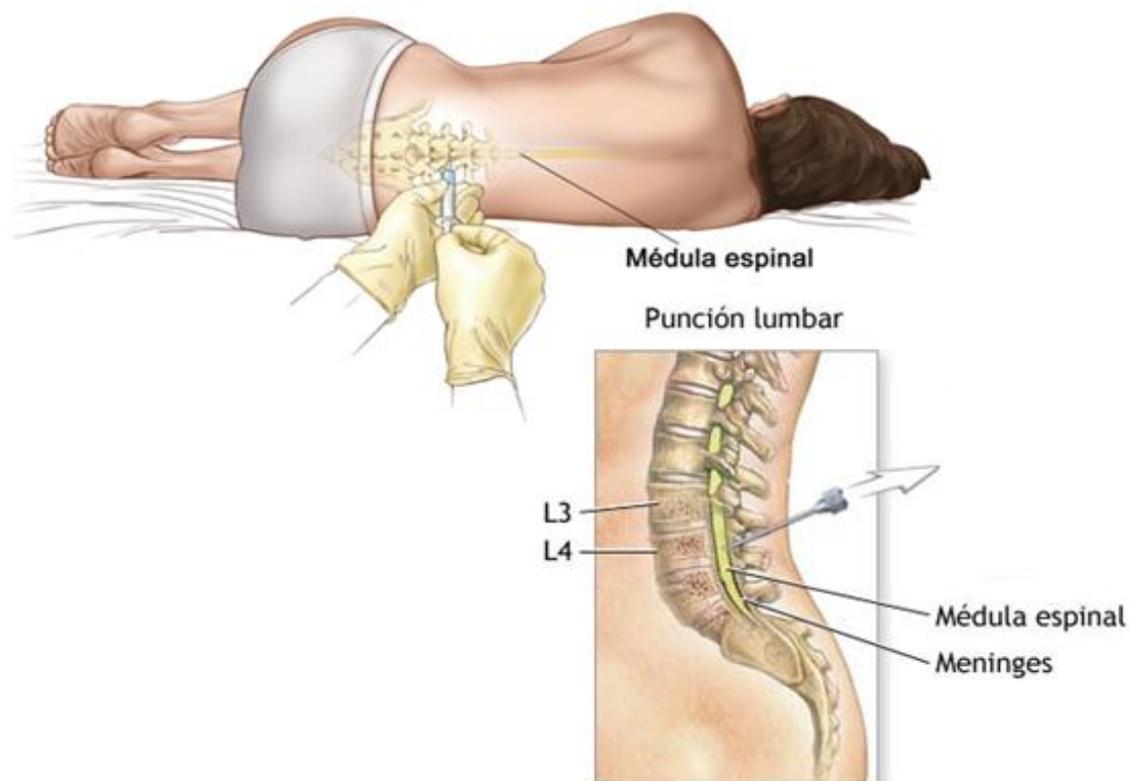
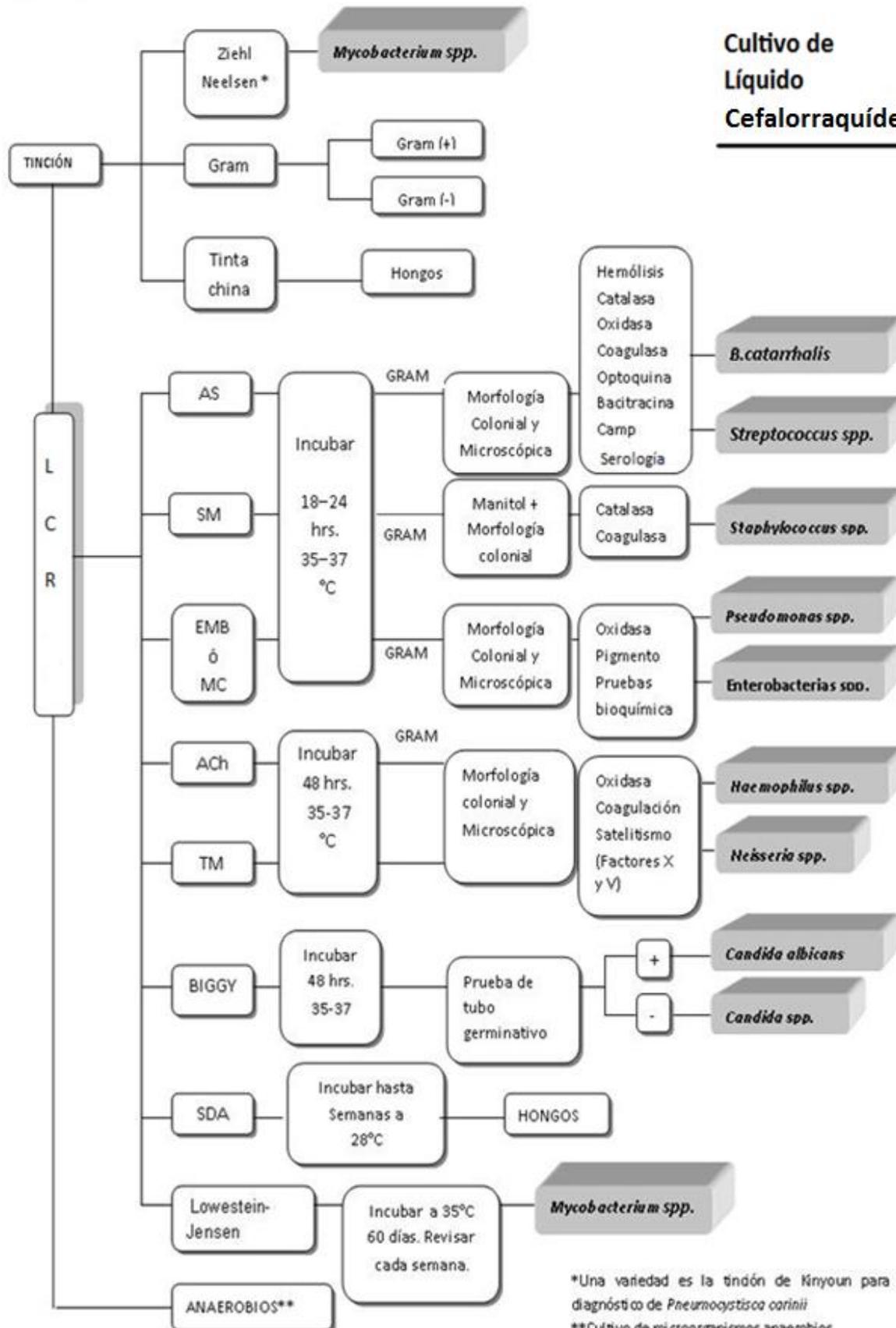


Figura 13. Toma de muestras de Líquido Cefalorraquídeo; Fuente:
<http://loyolauniversity.adam.com/.../es/19078.jpg>

Procedimiento

- De manera sistemática debe realizarse examen citoquímico, frotis y cultivo, de toda muestra de LCR.
- Separar 0.5 mL. Para cuenta total y diferencial de células.
- Centrifugar la muestra restante durante 15 minutos a 3000 rpm (salvo cuando se sospeche de *C. neoformans*). Del sobrenadante se procede a realizar examen químico y pruebas de detección de antígenos, y con el sedimento el estudio bacteriológico.
- Tinciones: del sedimento hacer tres frotis y teñirlos por el método de Gram, Ziehl-Neelsen y Tinta china.
- Cultivo: Recoger con el asa una porción del sedimento y sembrar en forma habitual en placas de AS, EMB y ACh. El aislamiento y la identificación se lleva a cabo por métodos estandarizados correspondientes a los diferentes microorganismos. (6)

Cultivo de Líquido Cefalorraquídeo



*Una variedad es la tinción de Kinyoun para el diagnóstico de *Pneumocystis carinii*

**Cultivo de microorganismos anaerobios

INFORME

El Líquido cefalorraquídeo es estéril, cualquier microorganismo presente agente causal de meningocelalitis. (6)

Sugerencia de reporte

Datos del Paciente			
Nombre: Cesar Martínez López			HOSPITAL REGIONAL Laboratorio de Microbiología 
Folio: 16030201	Edad: 30 años	Sexo: M	
CULTIVO DE LCR			
Tipo de Muestra: Líquido Cefalorraquídeo Características de la muestra: Aspecto Turbio purulento			
Gram: Diplococos Gram negativos Células: 10 000 neutrofilos segmentados Ziehl Neelsen: Negativo Tinta china: Negativo			
Identificación: <i>Neisseria meningitidis</i>			
Antibiograma: Amikacina R Ceftriaxona S Norfloxacin S Ampicilina R Gentamicina S Ceftazidima S Cefalotina R Ciprofloxacina S Imipenem R Meropenem R Cefotaxima S Cefepime S			
Fecha de Reporte terminado: 20/03/11		Elaboró: QFB Esperanza Reyes	Jefe de Laboratorio: QFB Jimena Meza

5. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Existe un gran número de agentes antibacterianos, susceptibles de ser empleados en el tratamiento. Todas las bacterias no tienen la misma sensibilidad a los distintos antibacterianos, de ahí la importancia de realizar estas determinaciones. La evaluación de esta sensibilidad nos va ayudar en la selección del compuesto más adecuado para el tratamiento de una infección bacteriana.

Las pruebas más utilizadas para evaluar la sensibilidad de una bacteria a un agente antibacteriano están basadas en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con distintas concentraciones del agente.

Método de difusión

El método de difusión de disco Kirby Bauer es el más recomendado por la *Food and Drug Administration* (FDA) y el *Clinical Laboratory Standar Institute* (CLSI) antes *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), cuyo principio es la difusión de un antibiótico contenido en un disco de papel filtro en una concentración conocida, colocado en la superficie de una placa de agar previamente inoculada con una cantidad controlada del microorganismo que se desea probar, produciéndose una zona de inhibición del desarrollo, de manera concéntrica de los microorganismos sensibles al antibiótico del disco.

Para su validez es necesario considerar lo siguiente:

- a) Estandarización de los discos antimicrobianos a concentración conocida.
- b) Estandarización del medio de cultivo. Uso de Mueller-Hinton en placas de 4 mm de espesor.
- c) Estandarización del Inoculo a una concentración de turbidez con solución salina o caldo de cultivo estéril equivalente al estándar de 0.5 de McFarland.
- d) Estandarización del tiempo de incubación, establecido de 18 horas para la difusión de antimicrobiano en agar y su reacción con los microorganismos en desarrollo.
- e) Medida de la zonas de inhibición, interpretando los resultados de las mediciones de acuerdo a la Tabla de conversión del CLSI.

Procedimiento

- A partir de las colonias aisladas, resuspender en solución salina estéril hasta lograr una turbidez equivalente al 0.5 de McFarland.
- Utilizar un hisopo de algodón estéril para tomar el inóculo: sumergirlo en la suspensión y eliminar el exceso presionándolo sobre la pared interna del tubo que lo contiene.
- Inocular la superficie de una placa de agar Mueller-hinton con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones. Por último, pasar el hisopo por el perímetro externo de agar. Dejar secar 5 minutos.
- Colocar los discos de los antibióticos sobre la superficie del agar utilizando unas pinzas estériles y apretándolos suavemente sobre la superficie del agar. Los discos no deben estar a menos de 15 mm de los bordes de la placa y lo bastante separados entre sí (aproximadamente 20 mm).
- Incubar la placa a 37°C durante 18 – 24 horas.
- Medir los diámetros de Inhibición.

Antibiograma

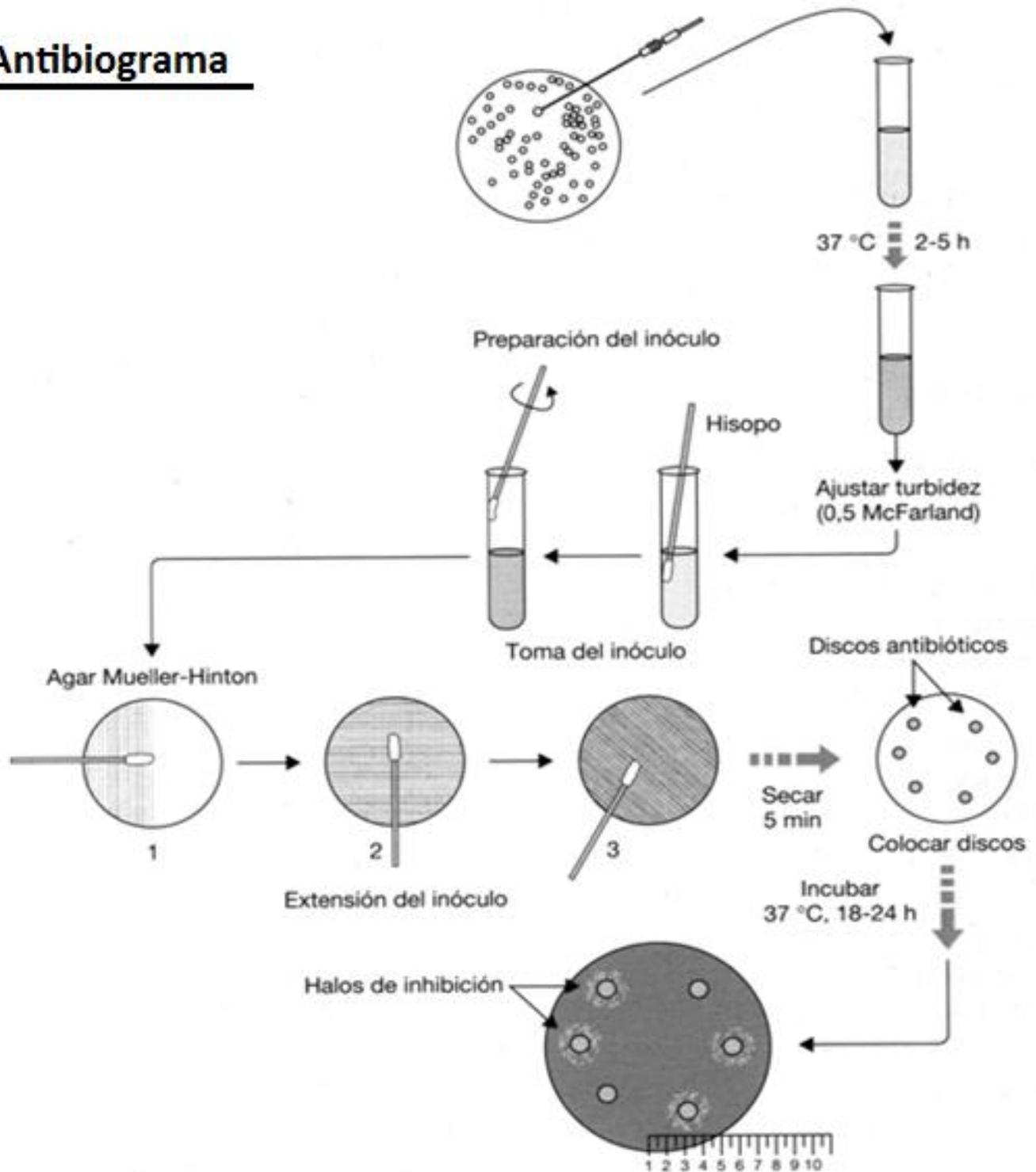


Figura 14. El método de difusión de disco Kirby Bauer; Fuente: Gamazo et al “Manual práctico de Microbiología” 2005.

INFORME

Los diámetros de los halos se traducen a las categorías de Resistente (R), Intermedio (I) o Sensible (S), dependiendo de la medida que presenta. Esto de acuerdo a los criterios Interpretativos de las tablas que el fabricante de los discos ofrece a los usuarios.

LIMITACIONES

Las técnicas de difusión no son aplicables a microorganismos de desarrollo lento, o a antimicrobianos de difusión lenta (como la Polimixina B). Si requiere incubación prolongada, el antimicrobiano puede deteriorarse o producir lecturas imprecisas. (6)

Sistemas Automatizados

La mayoría de estos sistemas se basa en la determinación del crecimiento bacteriano mediante espectrofotometría y nefelometría. También se han evaluado otras técnicas como radiometría, microcalorimetría, bioluminiscencia y resistencia e impedancia eléctricas.

a) Sistemas basados en la dilución en agar. En el sistema Repliscan (Repliscan System of Cathra, Inc. Ontario, Canadá) se realiza la determinación de la CMI por inoculación con el replicador de Steers y lectura automática de las placas, un computador elabora los resultados.

b) Sistemas Autobac (Autobac I y Autobac MIC) (General Diagnostic) y MS-2 (Abbott). En estos sistemas se emplea el método de elución en caldo. Los resultados se obtienen comparando el crecimiento bacteriano en presencia y ausencia de antimicrobiano; el crecimiento se calcula por la dispersión sufrida por un rayo de luz incidente sobre el cultivo bacteriano y los cálculos se realizan por un ordenador incorporado al sistema.

c) Sistema Auto-Microbic (AMS) (Vitek). En este sistema el antimicrobiano se encuentra liofilizado en las microcubetas de una tarjeta plástica; éstas se rehidratan con una suspensión del microorganismo a estudiar mediante un sistema de vacío; una de ellas sirve como control de crecimiento y el resto contiene dos o más concentraciones de antimicrobiano. La lectura se realiza por fotometría; una primera lectura sirve como línea basal de referencia para calcular posteriormente los cambios registrados por transmisión óptica.

d) Métodos basados en la técnica de microdilución. El empleo de dispensadores que llenan automáticamente las placas de microdilución con antimicrobianos prediluidos MIC-2000® (Dynatech laboratories), Anderson-Pasco® (Pasco) y Quick Spense II® (Bellco Glass) ha permitido la automatización parcial de la técnica de microdilución y la preparación de las

placas en el propio laboratorio. Las placas están liofilizadas y son fácilmente almacenables hasta que se utilicen. Existen sistemas automáticos de lectura de las placas de microdilución y mediante un ordenador se realiza la interpretación de los resultados, entre estos sistemas están Autoscan® (American Microscan). (39)

Limitaciones de los sistemas automatizados.

Los principales factores a considerar son el período de incubación y el tamaño del inóculo, debido a que la obtención de resultados en el mismo día exige períodos de incubación cortos, con lo que no llegan a manifestarse algunas propiedades bacterianas (factores de resistencia), como producción de betalactamasa, resistencia a meticilina y resistencia inducible a eritromicina en *Staphylococcus*. (39)

6. MONITOREO AMBIENTAL

Los programas de monitoreo ambiental, no solo radica en contar con información confiable en el momento oportuno, sino también son de gran utilidad para determinar el grado o nivel de confiabilidad para el desarrollo que se presentan en ciertas áreas del sector salud, no sólo en cuanto al número de ocasiones en que puede rebasar las normas o criterios ambientales, sino en la gravedad o nivel de importancia ambiental que puede generar cuando esto sucede, asimismo, la información obtenida con estos programas, puede servir para identificar instalaciones cuya confiabilidad es reducida, para tratar de corregir irregularidades y que el grado de incumplimiento no resulte significativo.

El control de la infección nosocomial producida por el ambiente es un factor fundamental cuando hablamos de algunas áreas críticas en las instituciones de salud, particularmente de las áreas quirúrgicas en los hospitales. La Organización Mundial de la Salud, en su Guía Práctica para la Prevención de las Infecciones Intrahospitalarias, llamaba la atención que a pesar del progreso alcanzado en la atención hospitalaria y de salud pública, siguen manifestándose infecciones en pacientes hospitalizados, que también pueden afectar al personal de los hospitales. Muchos factores propician la infección en los pacientes hospitalizados: la reducción de la inmunidad de los pacientes, al igual que la mayor variedad de procedimientos médicos y técnicas invasivas, que crean posibles vías de infección.

La verificación de la calidad ambiental en éstas áreas es un instrumento objetivo y valioso que sirve de guía al equipo humano que está implicado en el control de la infección nosocomial (servicio de mantenimiento, comités de infección nosocomial, dirección de medicina preventiva, laboratorio clínico).

El proceso de verificación, sistemático y documentado, consiste en obtener valores referenciados basados en normas vigentes, con el fin de determinar si las condiciones de las instalaciones cumplen con los criterios normativos que rigen la materia. (42)

El monitoreo ambiental establece:

- Metodología para la toma de muestra.
- Lugares de toma de muestra.
- Límites de tolerancia o criterios de aceptación o rechazo.
- Frecuencia de monitoreo.
- Acciones correctivas a tomar en caso de desvíos de los límites establecidos.

El programa de muestreo para monitoreo ambiental puede incluir:

- A) Determinación cuantitativa de microorganismos presentes en el ambiente (recuento total o recuento de determinados tipos de microorganismos).

- B) Determinación cualitativa de algunos patógenos y/o indicadores dependiendo de los ensayos que realiza el laboratorio (Ejemplo: Enterobacterias, Coliformes, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp*, *Staphylococcus aureus*).

6.1. Control microbiológico de aire

El control microbiológico del aire se integra como parte del proceso de aseguramiento de la calidad, que tiene en cuenta un riesgo de naturaleza microbiana, cualquiera sea el campo de actividad. La calidad microbiológica del aire es una necesidad, debido a los avances en el área técnica y científica nos lleva a cada vez más situaciones con alto riesgo microbiológico: caso de un enfermo puesto bajo el efecto de un tratamiento inmunodepresor o sufriendo una intervención quirúrgica larga y arriesgada en el plano infeccioso o personas que trabajan en un laboratorio con cepas microbianas altamente patógenas. (44)

Métodos para control de calidad del aire

- Método pasivo, por sedimentación (Exposición de placas):

Se realiza el recuento de microorganismos viables que se posan sobre una superficie de medio de cultivo (técnica cualitativa). No existe relación entre la cantidad de colonias encontradas en por placa y el volumen de aire.

- Método activo, captación por impacto:

Se realiza el recuento de microorganismos viables retenidos sobre una superficie de medio de cultivo forzando un determinado volumen de aire. (43)

Existen diversos métodos estandarizados de monitoreo del aire y muchas marcas de equipos para éste propósito, que difieren por el número de boquillas o impactores, y por el tamaño, así como el número de etapas por donde pasa el aire. En estos sistemas un volumen de aire es aspirado y conducido a través de una superficie perforada y es impactado sobre una placa conteniendo un medio de cultivo adecuado (una placa Petri estándar, una placa de contacto o en cintas de plástico). (42)

Captador de por impacto para control microbiológico del aire



Air IDEAL de Biomérieux

Figura 15. Sistema comercial Air IDEAL de Biomérieux; Fuente: www.biomerieux.es/servlet/.../dynPage?...

Tabla 12. Principales sistemas Comerciales para monitoreo de aire.

Sistema	Descripción	Utilidad
“SAS compact”	Captador por impacto en placa de Petri o placa de contacto.	Captación de bacterias y hongos.
Captador Burkard	Captador por impacto cinta de plástico.	La cinta puede permanecer durante una semana expuesta al aire. Gracias a los dispositivos mecánicos del aparato, el movimiento lento de la misma permite separar las capturas diarias. Captación de esporas de hongos.
Air IDEAL de Biomérieux	Captador por impacto en placa de Petri o placa de contacto.	Captación de bacterias y hongos.
MAS-100 NT[®] de Merck	Captador por impacto en placa de Petri o placa de contacto.	Captación de bacterias y hongos.

6.2. Control microbiológico de Superficies y Manipuladores

En lugares contaminados, donde pacientes inmunocomprometidos son sometidos a abordajes invasivos, los riesgos de infecciones secundarias son mayores, pero la limpieza, descontaminación y la desinfección terminal entre cada cirugía es el mejor procedimiento para la prevención de complicaciones postoperatorias. Es indispensable establecer sistemas integrales de vigilancia epidemiológica que permitan prevenir y controlar las infecciones de este tipo. Las prácticas higiénicas rutinarias tienen gran relevancia: la educación y promoción para la salud entre el personal trabajador de las instituciones sanitarias, así como de los enfermos y familiares, en particular, el lavado de manos con agua y jabón; lavado de ropa; esterilización de equipos, instrumental y materiales; la limpieza enérgica de los pisos y de las superficies de áreas donde se realizan cirugías, así como otros procedimientos para los que se requieren técnicas especiales. (45)

El laboratorio clínico y el laboratorio de microbiología son considerados como áreas de alto riesgo biológico e importantes fuentes generadoras de residuos patógenos. Durante el trabajo de Laboratorio se van utilizando materiales y equipos los cuales pueden ser reutilizables o desechables, así mismo las superficies de trabajo pueden resultar contaminadas ya sea con sustancias químicas o biológicas. (46)

Tabla 13. Análisis de superficies

Método	Tipo de Superficie	Descripción
Caja de contacto ó Petrifilm	plana	Contacto, presión y tiempo estándar
Hisopo	irregulares	Toma de muestra con hisopo estéril
Esponja-trapeado	irregulares	Esponja embebida en medio específico, siembra en volumen conocido

Análisis de manipuladores

El objetivo de un análisis a manipuladores es comprobar que la persona que procesa el alimento no es una fuente de contaminación. Se puede estudiar: manos, uñas y fosas nasales. (4)

Tabla 14. Áreas físicas de monitoreo ambiental hospitalario.

AREA	TOMA DE MUESTRA
Pediatría	Se realiza 2 veces por mes.
Quirófano	Se realiza 2 veces por mes.
C.E.Y.E	Se realiza una vez a la semana en hospital y clínica.
Dental	Se realiza una vez a la semana en hospital y clínica.
Autoclaves	Se realiza una vez por semana en hospital y clínica.
Medios de Cultivo	Se realiza una vez por semana.

El muestreo, se puede llevar a cabo en cada una de las áreas tomando en cuenta en dónde se tiene más contacto con los pacientes ejemplo: llaves, mesa de expulsión, algún equipo ya esterilizado, manija de refrigerador de medicamentos, mascarilla, licuadora, cuchillos, manos, uñas, marmitas, incubadoras etc....

Los resultados que se obtienen se proporcionan al jefe de servicio, en caso de que algún control resulte positivo inmediatamente se notifica al jefe del área encargada para darle seguimiento y aplicar medidas correctivas.

7. APENDICE

A) Microscopía

MICROSCOPIO DE CAMPO CLARO

El ojo humano solo puede discriminar (resolver) dos puntos separados por más de 0.1 mm (= 100 μ m). la mayoría de las células miden menos de ese tamaño y las estructuras celulares son más pequeñas aun; por eso, para el estudio de las células, es necesario usar instrumentos que permitan observarlas de mayor tamaño. Este instrumento es el microscopio (del griego *mikros*= pequeño y *skopein*= mirar).

Existen numerosos tipos de microscopios, adaptados para diferentes usos, algunos emplean una fuente energética diferente: microscopio de rayos X, ultravioletas, infrarrojo, de rayos beta, de ultrasonidos, electrónicos, protónicos, de neutrones, fotónicos, etc.

Los microscopios más potentes que se han construido hasta el momento son los electrónicos; con estos se puede obtener una información directa de estructuras que oscilan entre 0.4 y 200nm.

Sin embargo este tipo de microscopios es muy costoso. Teniendo fines de investigación.

Por su amplia aplicación y costo relativamente bajo, en enseñanza e investigación se utiliza especialmente el microscopio óptico compuesto de campo claro convencional, perteneciente al grupo de los microscopios ópticos o fotónicos, que utilizan la fracción visible del espectro.

El microscopio óptico convencional es compuesto porque posee dos sistemas principales de lentes convergentes (ocular y objetivo) (Figura 14), en cambio los microscopios simples o lupas, de menor aumento, presentan un solo sistema de lentes biconvexas o planoconvexas montadas en una armadura metálica. La mayoría de los modelos actuales son binoculares, aunque también hay monoculares.

El microscopio convencional se denomina “de campo claro” o de campo brillante” porque todo el campo se ilumina con una lente condensadora común, a diferencia de variedades que utilizan luz difractada, de fondo oscuro. Las muestras que se observan en el microscopio compuesto convencional deben ser traslucidas y estar teñidas para generar contraste.

El rendimiento y calidad de este microscopio dependen principalmente de sus lentes, de forma en que se combinan y de la iluminación empleada.

Un buen microscopio proporciona aumento adecuado, detalles exactos y entrega imágenes contrastadas de contornos definidos.

Además, la estructura mecánica debe poseer las características de estabilidad, confiabilidad y comodidad.

En la imagen del microscopio utilizado en el presente trabajo se pueden observar las partes de un microscopio compuesto.

Sistema óptico.

- OCULAR: Lente situada cerca del ojo del observador, amplía la imagen del objetivo.
- OBJETIVO: Lente situada cerca de la preparación, amplía la imagen de esta.
- CONDENSADOR: Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.
- DIAFRAGMA: Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.
- FOCO: Dirige los rayos luminoso hacia el condensador.

Sistema mecánico

- SOPORTE: Mantiene la parte óptica, tiene dos partes: el pie o base y el brazo.
- PLATINA: Lugar donde se deposita la preparación.
- CABEZAL: Contiene los sistemas de lentes oculares, puede ser monocular o binocular.
- REVÓLVER: Contiene los sistemas de lentes objetivos, permite al girar, cambiar los objetivos.
- TORNILLOS DE ENFOQUE: Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico que consigue el enfoque correcto.

Microscopio Óptico

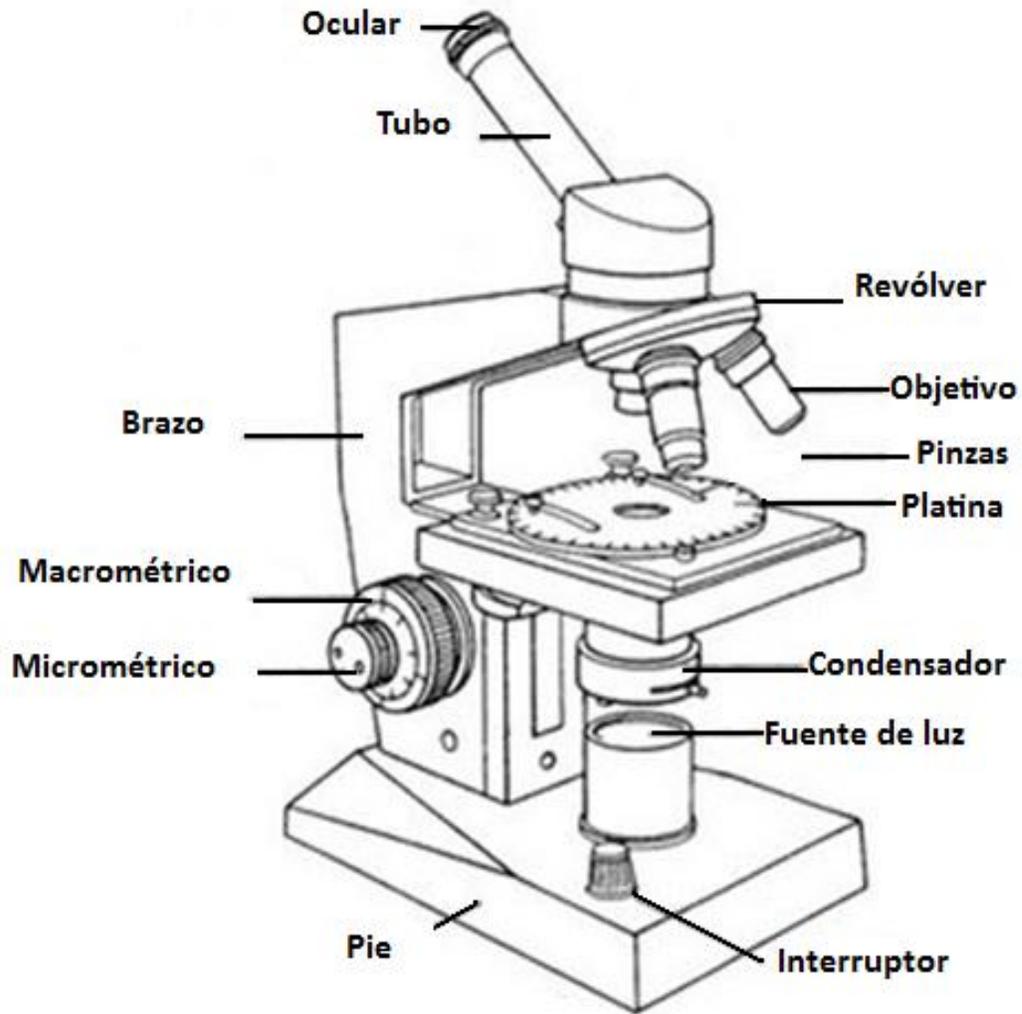


Figura 16. Esquema de microscopio óptico; Fuente: <http://sarahiviolinist.blogspot.com/>

CONSIDERACIONES GENERALES

El aumento visual:

Es la relación entre el tamaño de la imagen producida por el microscopio y el tamaño real del objeto observado. Indica el número de veces que la imagen es mayor que el objeto y se expresa en “X”, POR EJEMPLO 40x significa que la imagen es 40 veces mayor que el objeto.

Como el microscopio compuesto posee dos sistemas de lentes que aumentan sucesivamente la imagen, el aumento total se obtiene multiplicando el aumento del sistema ocular por el aumento del sistema objetivo, siempre que la distancia entre ambos sea la correcta (largo mecánico del tubo generalmente 160 o 170 mm) y que no existan otras lentes intermedias.

La resolución:

Es la propiedad de un sistema óptico de discriminar detalles muy finos. Consiste en hacer visibles como independientes dos puntos muy cercanos entre sí.

El inverso del poder de resolución es el límite de resolución (L.R). Distancia mínima entre dos puntos del objeto observados como distintos.

Los microscopios óptimos modernos tiene un límite de resolución de 0.2 a 0.4 μm , aproximadamente 1/20 del diámetro de un eritrocitos humano normal.

El límite de resolución depende de la longitud de onda de la emisión empleada y del ángulo que forman los rayos más externos que penetran a la lente. Cuanto menor sea la longitud de onda empleada y más ancho el cono de luz, menor será el límite de resolución y en consecuencia mayor su poder.

La definición:

Es la capacidad de producir imágenes de contornos delimitados y nítidos. Los menores poderes de definición se encuentran en sistemas de lentes objetivos con alto grado de corrección óptica, que eliminan al máximo las aberraciones.

Existen lentes con diferentes grados de corrección de las aberraciones: acromáticos, apocromáticos, semiapocromáticos. Los más utilizados y más económicos son los acromáticos, en los que esta corregida la aberración esférica de un color y la aberración cromática de dos colores.

Se denominan aberraciones a los defectos de corrección del sistema óptico. Las aberraciones cromáticas producen imágenes difusas con un halo coloreado alrededor del campo debido a la diferencia de longitud focal en función de la longitud de onda. Al pasar de un medio a otro de diferente índice de refracción, cada color que forma parte de la luz blanca experimenta una desviación diferente.

Las aberraciones de esfericidad se deben a que los rayos cuando atraviesan la zona periférica de una lente simple recorren un trayecto algo mayor que cuando pasan por el centro, produciéndose un efecto del prisma. A partir de un foco lumínico puntual se forman imágenes superpuestas de diferentes tamaños, dando una imagen poco nítida de bajo contraste.

Luminosidad:

Es la impresión visual de la luz reflejada o emitida por una superficie. La luminosidad de la imagen microscópica depende de la fuente de iluminación, el condensador, los filtros, el medio óptico y la luminosidad del objetivo. la fuente lumínica más utilizada es la lámpara incandescente.

OPERACIÓN DEL MICROSCOPIO

El microscopio es un instrumento de precisión que debe tratarse con cuidado y manejarse correctamente para evitar errores, cansancio y pérdida de tiempo.

1. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior ya debería estar en esas condiciones.
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándolas con las pinzas metálicas.
3. Ajustar la distancia entre los oculares de acuerdo a la separación de los ojos del observador, asegurando que la observación se realiza con ambos ojos abiertos, para evitar la contracción muscular y la precisión sobre el globo ocular.
4. Comenzar la observación con el objetivo de 10x (que ya está en posición) o colocar el de 40 aumentos (40x) dependiendo de la preparación que se vaya a observar.
5. Para realizar el enfoque:
 - a. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando macroscópicamente, no a través de los oculares, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
 - b. Mirando, ahora si a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el tornillo micrométrico y cuando se observe una imagen nítida de la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.

6. Pasar al siguiente objetivo de (40x). la imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el tornillo micrométrico para lograr el enfoque fino.

Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 4. El objetivo de 40x enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.

7. Empleo del objetivo de inmersión.

- a) Bajar totalmente la platina.
- b) Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que colocar la gota de aceite.
- c) Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión (100x) dejándolo a medio camino entre este y el de 40x.
- d) Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
- e) Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
- f) Mirar directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.
- g) Enfocar cuidadosamente con el tornillo micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es mayor.
- h) Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya **NO SE DEBE** volver a usar el objetivo de 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por lo tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 4.
- i) Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En ese momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe de retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- j) Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x esté perfectamente limpio.

CUIDADOS Y MANTENIMIENTO

1. Debe mantenerse el microscopio en un lugar estable, el observador debe colocarse de espaldas a los focos de luz, prefiriéndose la luminosidad amortiguada, lejos de las ventanas y sobre una mesa negra para eliminar luces parasitas y evitar una fatiga innecesaria.
2. Debe colocar el microscopio lejos del extremo de la mesa, para evitar que se vuelque. La mayoría de los desperfectos se producen por golpes.
3. El microscopio se transporta verticalmente, sujeto por el brazo con una mano y por la base con la palma de la otra. El transporte incorrecto puede dañar alguno de sus componentes.
4. Debe cubrirse mientras no se usa y no es conveniente sacarle los oculares. El polvo se deposita en las lentes y desgasta los componentes.
5. No es correcto tocar los lentes oculares, objetivos ni condensador con los dedos ya que las manchas de grasa y sudor las dañan.
6. Las lentes pueden soplar energéticamente con una pera de goma pero no deben limpiarse con un paño seco (las partículas de polvo pueden rayarlas).

B) Clasificación de bacterias de importancia médica

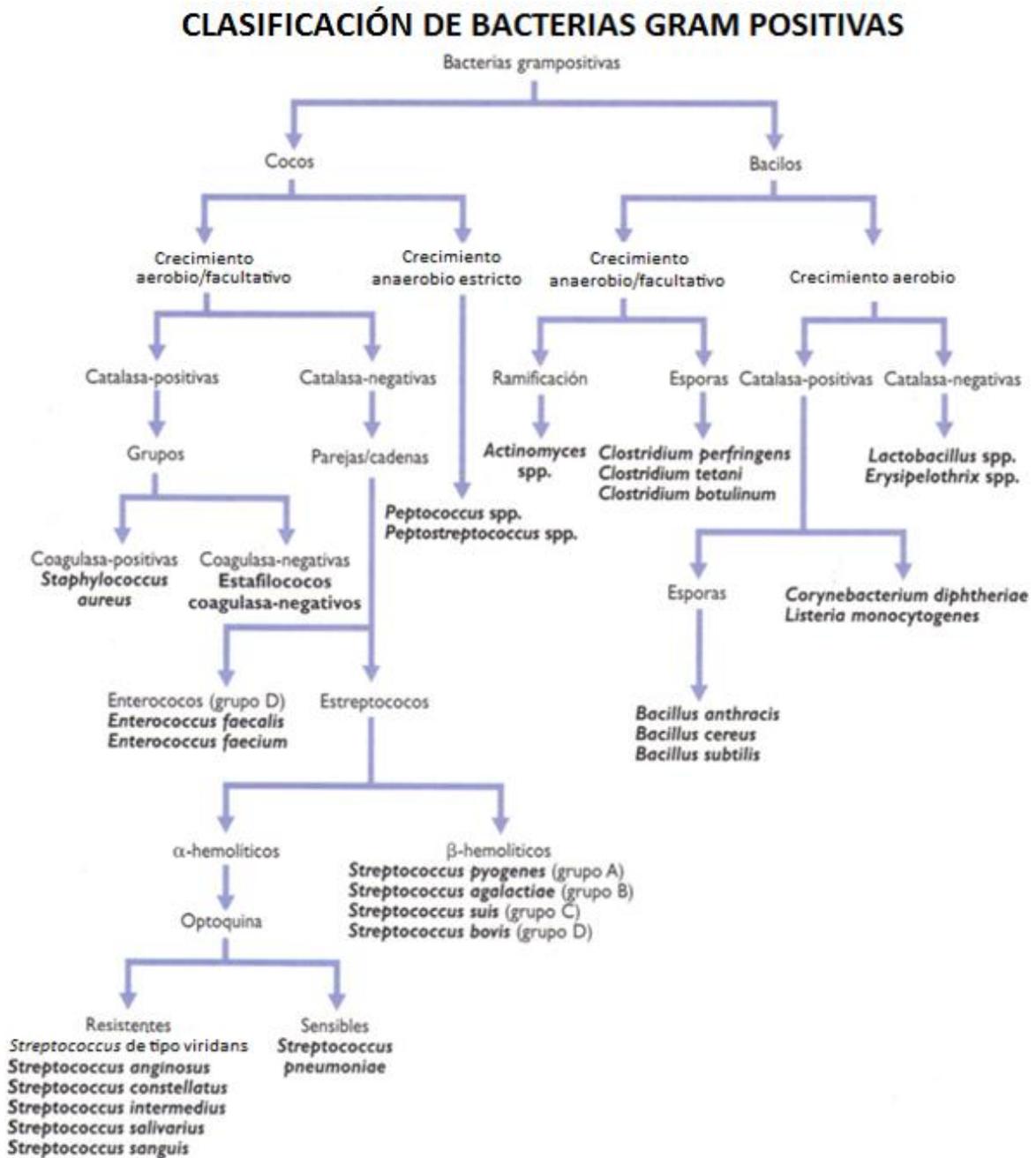


Figura 17. Clasificación de bacterias Gram positivas; Fuente: J.K. Struthers, R.P. Westran, "Bacteriología Clínica" 2005.

CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

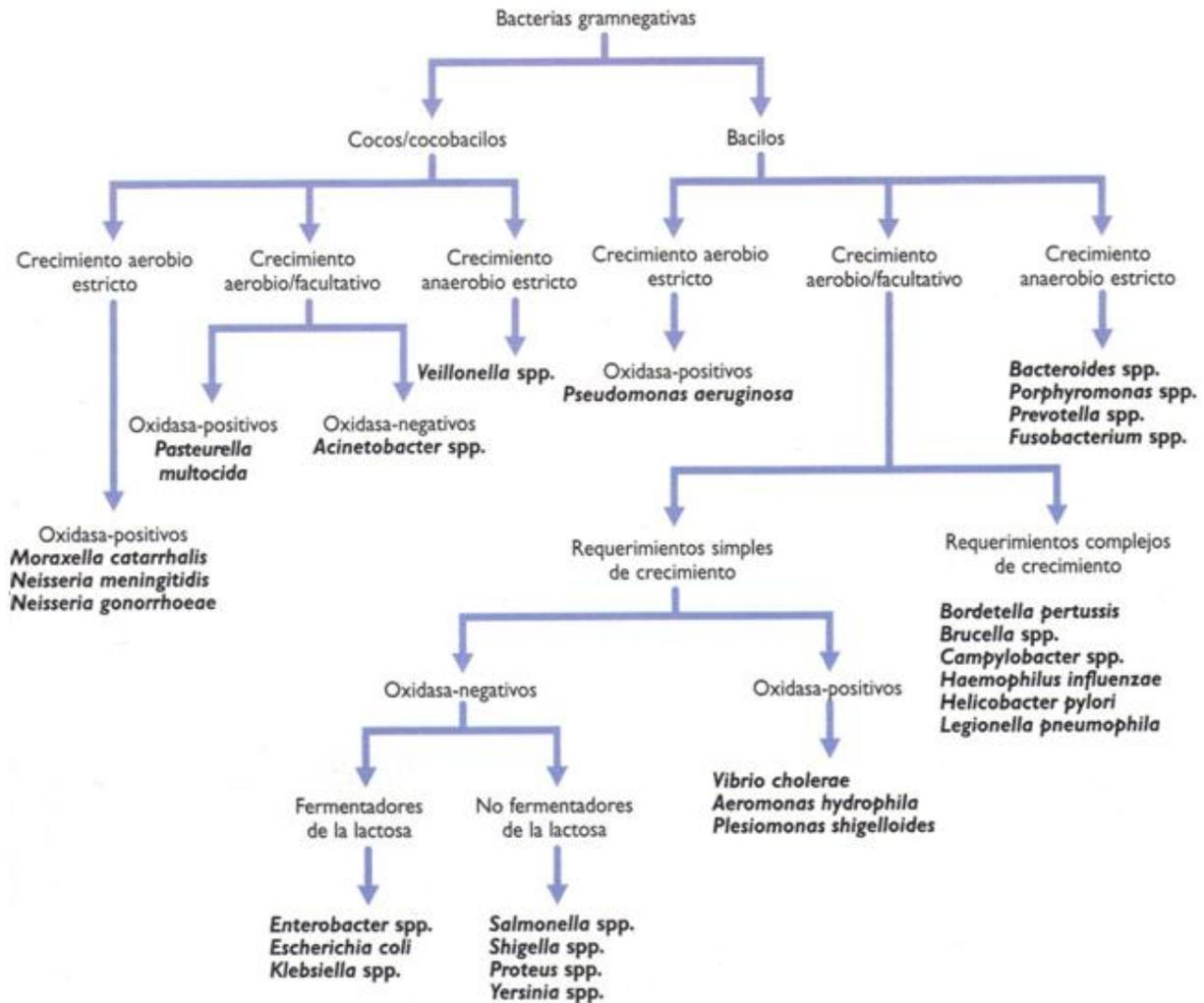


Figura 18. Clasificación de bacterias Gram negativas; Fuente: J.K. Struthers, R.P. Westran, "Bacteriología Clínica" 2005.

C) Técnicas de sembrado

El instrumento más utilizado para éste propósito es el asa de inoculación o bacteriológica que puede ser de alambre de platino, o nicromo y se inserta al mango. Hay asas calibradas para tomar un volumen constante de inóculo, la más utilizadas son de 10 μL y 1 μL .

Inoculación de medios de cultivos sólidos en cajas Petri

Para un aislamiento primario de bacterias, todo el proceso se realiza en zona estéril; junto a un mechero y abriendo la caja solo las veces que sean necesarias.

Los pasos son los siguientes:

- Con una asa esterilizada por flameo, se colocan dos tomas del material cerca del borde de la placa y se hace una estría inicial.
- Se vuelve a flamear el asa y se deja enfriar.
- Se distribuye la muestra en la placa por estrías presionando pero sin perforar el agar.
- Se flamea el asa y se deja enfriar.
- A partir del extremo de la primera estría se realiza una segunda y así sucesivamente hasta completar 4 estrías

Al concluir el sembrado se vuelve a flamear el asa.

Una vez inoculadas las placas se incuban en posición invertida a 37°C y se examinan cada 24 hrs, después de 48 hrs. Se pueden apreciar diversas colonias.

Inoculación en tubos de agar inclinado.

Se realiza esta inoculación para mantener cepas puras y/o efectuar pruebas bioquímicas.

La inoculación debe hacerse de una colonia aislada de una placa de resiembra, con el asa recta se traslada el inóculo al medio sin llegar al fondo del tubo y estriar la superficie con el mismo inóculo.

Inoculación en tubos con medio sólido horizontal

Se utiliza un asa recta, se inocula por picadura evitando tocar el fondo del tubo.

Inoculación de medios semisólidos

Se emplea para observar la motilidad, carbohidratos o pruebas bioquímicas, se inocula con una asa recta sin llegar al fondo del tubo.

Inoculación de medios líquidos

Se efectúa con asa a partir de la muestra, agitándolas dentro del medio de cultivo (caldos de cultivo).

El crecimiento se manifiesta de las siguientes formas:

Enturbiamiento: opacidad más o menos densa.

Formación de velo: pequeña masa de células que flota en la parte superior del cultivo.

Sedimento: depósito celular que permanece en la parte inferior del cultivo.

TOMA DEL INOCULO

La toma de inóculo (de una muestra que hay que examinar, de un medio sólido, de un tubo líquido, etc.) es simple, pero requiere alguna atención. Se recomiendan los pasos siguientes

Pasos a seguir para la toma del inóculo

1 Colocar frente a usted el mechero y la preparación o muestra que contiene los microorganismos así como el resto del material necesario (portaobjetos, tubos, placas).

2 Tome el asa de siembra y flamee el filamento hasta que este alcance un rojo incandescente. Enfríelo en la proximidad de la llama unos 10 seg.

3 Tome con la otra mano el (tubo, placa) con la muestra, si esta en tubo quite el tapón con los dedos meñique y anular y flamee la boca del tubo. Si es en placa, coloque esta invertida y levante la parte que contiene el medio de cultivo de los microorganismos, llévela a la proximidad de la llama del mechero.

4 Trabajando cerca de la llama, introduzca el asa de siembra y tome una pequeña muestra del cultivo. Si el medio es líquido, agítelo ligeramente el tubo y tome una muestra que quedara adherida, por tensión superficial, en el extremo del filamento del asa de siembra. Si es en placa tome una pequeña porción de aquellos mediante un ligero roce con el asa de siembra.

5 Trasfiera el inóculo a otro medio de cultivo estéril, tomando en cuenta las mismas precauciones en su manejo (flameando bocas de tubos, trabajando en la proximidad de la llama, etc.) o bien proceda a preparar un frotis para tinción.

6 Una vez realizada la transferencia: en tubo, flamee la boca de estos antes de colocar el tapón. Marque los tubos con la identificación del cultivo, fecha y nombre. Incube a temperatura adecuada durante el tiempo necesario para que se desarrollen los m.o. Si se realiza sobre un medio contenido en una placa de Petri tape la placa. Está se incubara en posición invertida para evitar que el agua de condensación se deposite sobre la superficie del agar, lo cual impedirá la obtención de colonias aisladas, marque en la base de la placa la identificación del cultivo.

7 Antes de dejar el asa de siembra sobre la mesa, flaméela de nuevo con el objeto de esterilizarla.

Toma del inoculo

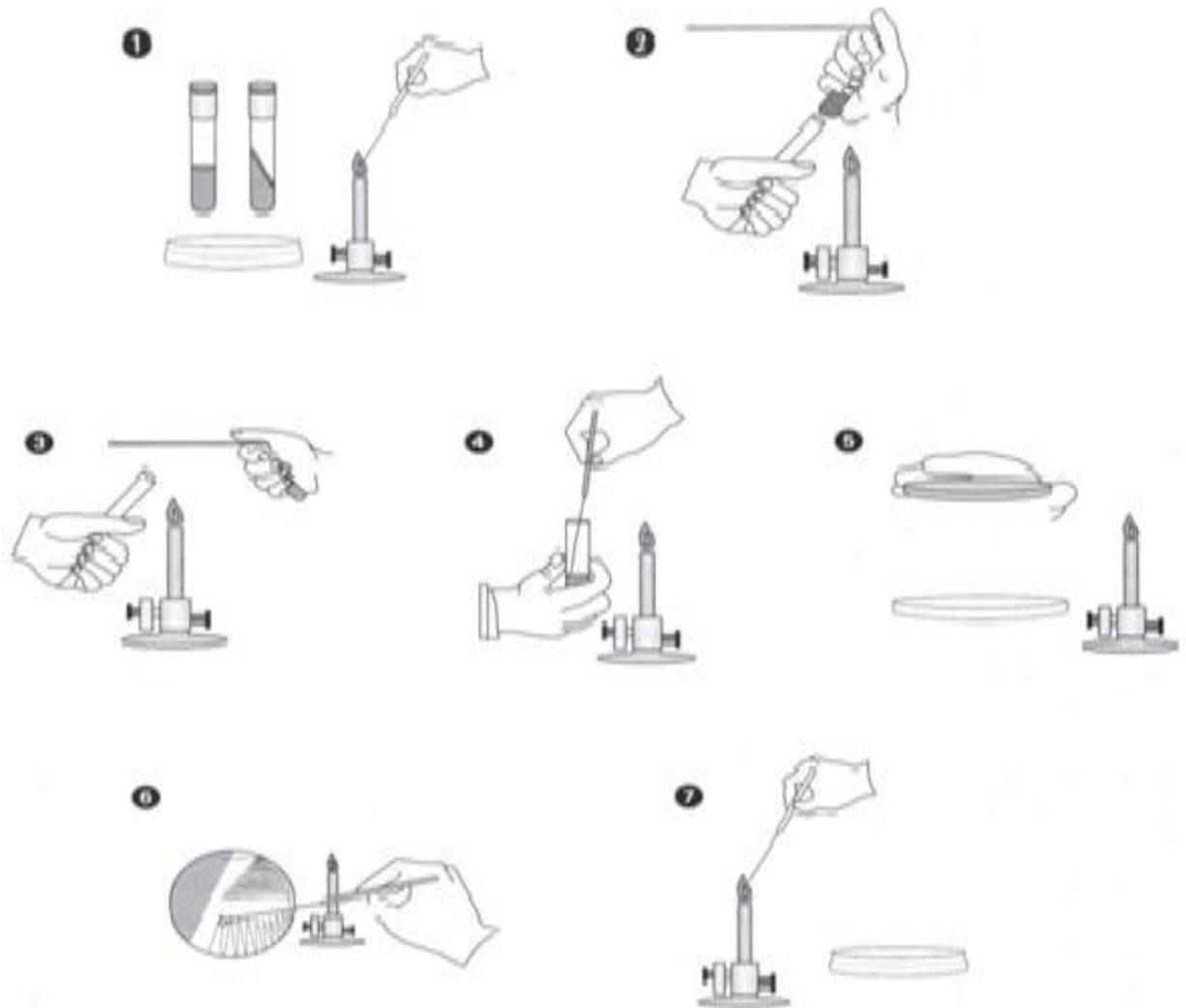


Figura 19. Técnica de Sembrado en placa; Fuente: Gamazo et al “Manual práctico de Microbiología” 2005.

D) Esterilización y Desinfección.

ESTERILIZACIÓN

La esterilización se define como el proceso por el cual se libera a cualquier objeto, superficie o medio de todos los microorganismos que se encuentran contaminándolo ya sea en estado vegetativo o esporulado, por remoción o muerte de estos y se logra por medio de calor. Los agentes esterilizantes en general se clasifican de la siguiente manera.

Agentes Físicos

- Calor húmedo: Vapor por presión (autoclave)
Vapor a la presión atmosférica
- Calor seco: flameado
Incineración
Aire caliente
- Filtración: Bujías
Filtros de profundidad de asbesto
Discos de membrana
- Radiación no ionizante: Rayos ultravioleta
Rayos infrarrojos
- Rayos ionizantes: Rayos gama
Electrones de alta energía

Agentes Químicos: Gases oxido de etileno (cámara de gas)

Vapor bajo presión:

La esterilización con vapor bajo presión se realiza a temperaturas que oscilen entre 108 y 147° C y presión de 15 lb, durante 30 a 45 min. Dependiendo del propósito que se persiga.

Ciclos de Esterilización

Medios de cultivo (caldo): 115°C, 10 lb, 15 min.

Medios de cultivo (gelosa) 121 °C, 15, 15 min.

Cultivos infectados: 126 °C, 20 lb, 15 min.

Ropa, material de curación e instrumentos: 126° C, 1.5 Kg/cm², 15 min.

Ropa, material de curación e instrumentos infectados: 134° C, 2.1Kg/cm², 15 min.

Control de Esterilización

Se utiliza para determinar la eficiencia de la esterilización con calor húmedo. Se utilizan las esporas de *Bacillus stearothermophilus* como microorganismo de prueba. Este microorganismo en forma vegetativa se desarrolla a la temperatura de 55-60°C. Las esporas deben ser expuestas a 121°C/ 12 min. Para morir.

Se impregnan tiras de papel con 10^6 esporas y se colocan en distintas partes de la autoclave, después de la esterilización se siembran las tiras en medios de cultivos adecuados (caldo con dextrosas) y se incuban a 55°C, durante 5 días para comprobar la esterilidad.

DESINFECCIÓN

La desinfección consiste en la construcción de microorganismos y esporas patógenas que puedan causar infección

Desinfectante

- Agente: Producto químico que mata las formas vegetativas de los microorganismos patógenos. Pero no necesariamente las formas resistentes o esporas. Se aplican superficies inanimadas
- Antisépticas: Producto que destruye o inhibe el crecimiento y la actividad de los microorganismos, se aplica sobre superficies animadas.
- Higienizante: agentes que reduce la población microbiana a niveles no perjudiciales; Es un agente químico que destruye el 99.99 % de las bacterias en crecimiento. Se aplica sobre objetos inanimados que entran en contacto con alimentos.
- Germicida: Lo mismo que el desinfectante aunque se aplica contra toda clase de gérmenes.
- Bactericida: Es cualquier agente que destruye las bacterias.
- Bacteriostático: Un estado donde se encuentra impedido el crecimiento de las bacterias

Tabla. 15 Clasificación de los desinfectantes.

AGENTES FISICOS	AGENTES QUIMICOS
<p>Calor húmedo: pasteurización.</p> <p>Calor seco: ebullición.</p>	<p>Fenol y compuestos fenolicos</p> <p>Aldehídos</p> <p>Halógenos</p> <p>Metales pesados y sus compuestos</p> <p>Agentes tensoactivos</p> <p>Ácidos y álcalis</p> <p>Peróxido de hidrogeno</p> <p>Colorantes</p>

Descripción de algunos desinfectantes

Alcoholes: Los más comunes son el alcohol etílico y el isopropílico, se utilizan como antisépticos cutáneos y actúan desnaturalizando proteínas bacterianas. Para que los alcoholes sean activos como agentes mortales deben mezclarse con agua, a una concentración al 70% de alcohol en agua.

Iodo: (tintura) yodopovidona sol. al 10% es un yodóforo, complejo de povidona, un polímero soluble en agua, con aniones de triyodado I_3^- , que contienen aproximadamente un 10% de yodo activo, no afectan negativamente el proceso de curación y dejan un depósito de yodo activo, creando el llamado efecto remanente o persistente.

La ventaja de los antisépticos con yodo es su amplio espectro de actividad antimicrobiana, ya que eliminan todos los patógenos principales y, con tiempo suficiente, las esporas, que se consideran la forma de microorganismo más dificultosa de desactivar mediante desinfectantes y antisépticos.

Aldehídos: Formaldehído: se utiliza para desinfectar un recinto cerrado a temperatura ambiente y humedad relativa entre 60 y 80 % formol al 4% es buen desinfectante.

Fenoles: el fenol, es una sustancia muy corrosiva y tóxica además de cancerígena para los tejidos, pero tiene excelentes propiedades preservativas y se utiliza en preparaciones biológicas y de laboratorio al 0.5 %. A concentraciones elevadas actúa como desinfectante.

E) Preparación de frotis y técnicas de tinción.

La preparación de un frotis o extensión sobre un portaobjetos es imprescindible para poder aplicar los métodos habituales de tinción que permiten la observación al microscopio de las bacterias.

FUNDAMENTO

La fijación de una extensión bacteriana es imprescindible para que las bacterias queden inactivadas y adheridas al vidrio. De esta manera, no se pierden en los pasos de lavado necesarios para la tinción. Se debe procurar, además, que este proceso altere lo menos posible la morfología bacteriana

Si las bacterias se encuentran resuspendidas en agua, la fijación puede hacerse por calentamiento de la muestra sobre el portaobjetos. Es sumamente importante no excederse en este proceso para que las bacterias no se deformen o se rompan. La fijación de bacterias que se hallan en su propio medio de cultivo debe hacerse empleando un procedimiento alternativo como la fijación del metanol, sobre todo si se trata de un microorganismo muy virulento. (*Brucella*, *Mycobacterium*, etc)

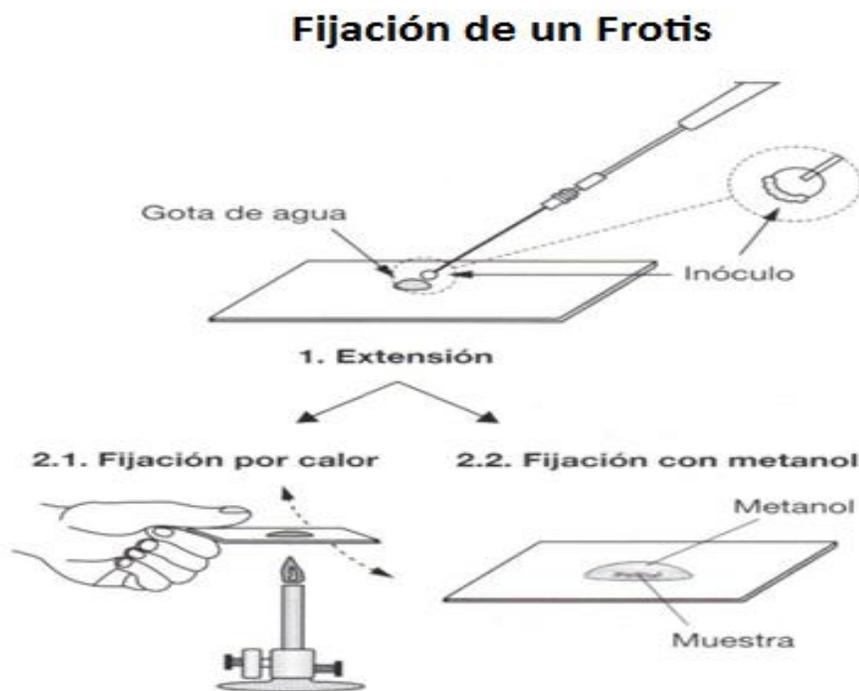


Figura 20. Fijación de un frotis; Gamazo et al "Manual práctico de Microbiología" 2005.

Tabla 16. Técnicas de tinción para bacterias

Tinción	Uso	Técnicas
Tinciones simples	Un colorante; proporciona contraste para observar mejor un organismo completo	Se tiñe con un colorante básico (azul de metileno, cristal violeta, o fucsina básica) durante 2 - 5 min. Lavar brevemente con agua. Se tiñen casi todas las bacterias; la mayoría de los tejidos no se tiñen.

Tinciones diferenciales

Tinción	Uso	Técnicas
Tinción de Gram	Dos o más colorantes; distingue entre bacterias Gram positivas y Gram negativas	Se cubre la preparación de bacterias fijadas con cristal violeta y después con una solución de yodo (mordiente). Todas las células quedan teñidas de color violeta oscuro. Se decolora con acetona al 95% o sol. alcohol-acetona 50%, c/u. Las células Gram positivas permanecen teñidas, pero las negativas pierden el colorante. Se tiñe con safranina (contraste). El color violeta de las Gram positivas se vuelve más oscuro y las Gram negativas se tiñen de rosa.
Tinción de ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen)	Dos colorantes; distingue entre las micobacterias (ácido-alcohol resistentes) y el resto de las bacterias	Se tiñen las células con fucsina básica y se calienta a emisión de vapores durante 5 minutos. Todas las bacterias se tiñen de rojo. Se decolora brevemente con una mezcla de alcohol-HCL al 3%. Las bacterias resistentes permanecen teñidas de rojo; todas las demás se decoloran. Se trata con el colorante de contraste azul de metileno o verde de malaquita. Las bacterias ácido-alcohol resistentes continúan teñidas de rojo, las otras se tiñen de azul o verde de malaquita.
Variante Tinción de Kinyoun	La tinción se hace igual pero en frío, es decir sin el calentamiento.	

Tinciones específicas

Tinción	Uso	Técnicas
Tinción de esporas de Schaffer y Fulton	Tiñe selectivamente las endosporas	Se cubre la preparación con verde de malaquita y se calienta a emisión de vapores durante 60 segundos. Se lava con agua durante 30 segundos y se tiñe con safranina. Las endosporas retienen el color verde; el resto de la célula toma el color rosa.
Tinción de flagelos de Leifson	Permite observar los flagelos	A las células previamente fijadas, se le añade una mezcla de ácido tánico (mordiente) y del colorante rosanilina. El mordiente engruesa los flagelos y el colorante los tiñe.
Tinción negativa con tinta china	Revela la presencia de cápsulas	Se utiliza tinta china o nigrosina para teñir una preparación en fresco del espécimen. Las partículas de colorante no pueden penetrar en la cápsula, que se observa como una región clara alrededor de la célula.

F) Preparación de Medios de cultivo

Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme; por ello, la variedad de medios de cultivo es también grande, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos.

Tabla 17. Constituyentes habituales de los medios de cultivo.

AGAR	Se utiliza como agente lificante para dar solidez a los medios de cultivo, el componente dominante en el agar bacteriológico es un polisacárido, al que acompañan algunas impurezas y que se obtienen de ciertas algas marinas, el agar no es empleado como nutriente.
EXTRACTOS	Para su preparación, ciertos órganos o tejidos animales o vegetales (p.eje. carne, hígado, cerebro, semilla). Son extraídos con agua y calor, posteriormente concentrados hasta la forma final de pasta o polvo. Estos preparados deshidratados son frecuentemente empleados en la confección de medios de cultivo ejemplo: extracto de carne, de levadura, de malta etc.
PEPTONAS	Son mezclas complejas de compuestos orgánicos nitrogenados y sales minerales que se obtienen por digestión enzimática o química de proteínas animales o vegetales (soya, carne, gelatina, caseína, etc.). Las peptonas son muy ricas en péptidos y aminoácidos, pero pueden ser deficientes en determinadas vitaminas y sales.
FLUIDOS CORPORALES	Sangre completa, sangre desfibrinada, plasma o suero sanguíneo son frecuentemente añadidos a los medios empleados para el cultivo de algunos patógenos. La sangre no puede ser esterilizada y debe, por tanto, ser obtenida en condiciones asépticas directamente de un animal sano, los fluidos corporales no solamente contribuyen con factores de crecimiento, sino también con sustancias que neutralizan inhibidores del crecimiento de algunas bacterias.

SISTEMAS AMORTIGUADORES	Algunos componentes son incorporados al medio de cultivo para mantener el pH dentro del rango óptimo del crecimiento bacteriano. Los microorganismos más comunes son neutrofilos (el pH óptimo para su crecimiento está próximo a la neutralidad), y sales como fosfatos bisódicos o bipotásicos, o sustancias como las peptonas, previenen una desviación del pH.
INDICADORES DE pH	Indicadores ácido-base se añaden a menudo a los medios de cultivo con objeto de detectar variaciones del pH visualizados como cambio de color.
AGENTES REDUCTORES	Cisteína, tioglicolato y otros son agentes reductores que se añaden a los medios de cultivo para crear condiciones que permitan el desarrollo de los gérmenes microaerófilos o anaerobios.
AGENTES SELECTIVOS	La adición de determinadas sustancias al medio de cultivo pueden convertirlo en selectivo. Por ejemplo, cristal violeta, sales biliares, azida sódica, telurito potásico, antibióticos, etc. A la concentración adecuada, actúan como agentes selectivos frente a determinados microorganismos.

Tabla 18. Tipos de medios de cultivo.

MEDIOS USUALES	Contienen sustancias nutritivas mínimas para el crecimiento de las bacterias metabólicamente no exigentes y son utilizados para la preparación de otros medios (enriquecidos, selectivos, etc.). (2)
MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO	Favorecen el crecimiento de un determinado tipo de microorganismos, sin llegar a inhibir totalmente el crecimiento del resto. Están adicionados o enriquecidos con nutrientes. Ejemplo: AS, BHI. (4)
MEDIOS SELECTIVOS	Permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás. Ejemplo: MC, EMB y SM.(4)
MEDIOS ENRIQUECIDOS	Son medios líquidos que cumplen la misma función que los selectivos. Tras su incubación debe sembrarse por agotamiento en un medio selectivo sólido para obtener colonias aisladas de la bacteria buscada. Ejemplo: TCBS, CSeF. (2)
MEDIOS DIFERENCIALES	Son aquellos en los que se ponen de relieve propiedades que un determinado tipo de microorganismos posee y otros no. Ejemplo: MC, EMB, SM, AS, SS.

Preparación de medios de cultivo

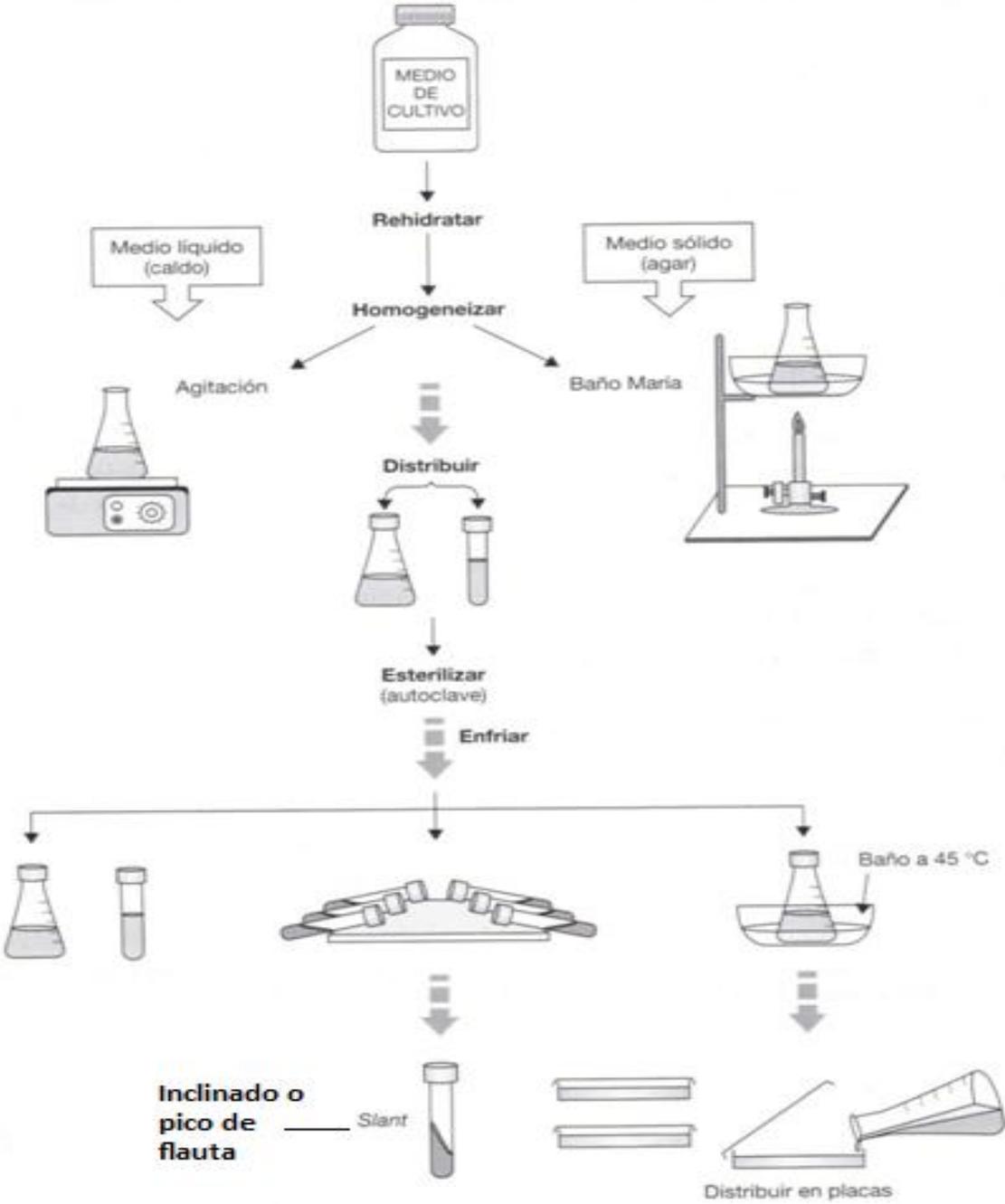


Figura 21. Preparación de medios de cultivo; Gamazo et al “Manual práctico de Microbiología” 2005.

G) Técnicas Inmunoenzimáticas

Inmunofluorescencia

Se utiliza esencialmente en la detección de antígenos y anticuerpos contra antígenos de superficie de células y tejidos. Para ello se emplean anticuerpos preparados frente a la proteína que se desea detectar marcados con moléculas fluorescentes. Se aprecia si hubo unión del anticuerpo con el antígeno por la fluorescencia emitida, que se observa bajo microscopio de luz ultravioleta. Este procedimiento (*Inmunofluorescencia directa*) tiene la limitación del marcaje con un fluorocromo de cada uno de los anticuerpos necesarios para cada una de las sustancias a investigar. Para evitar esto, lo que se hace es tratar el tejido o células con antiseros anti-antígeno producidos, por ejemplo, en conejo y secundariamente anti-inmunoglobulinas marcadas con un fluorocromo (*Inmunofluorescencia indirecta*).

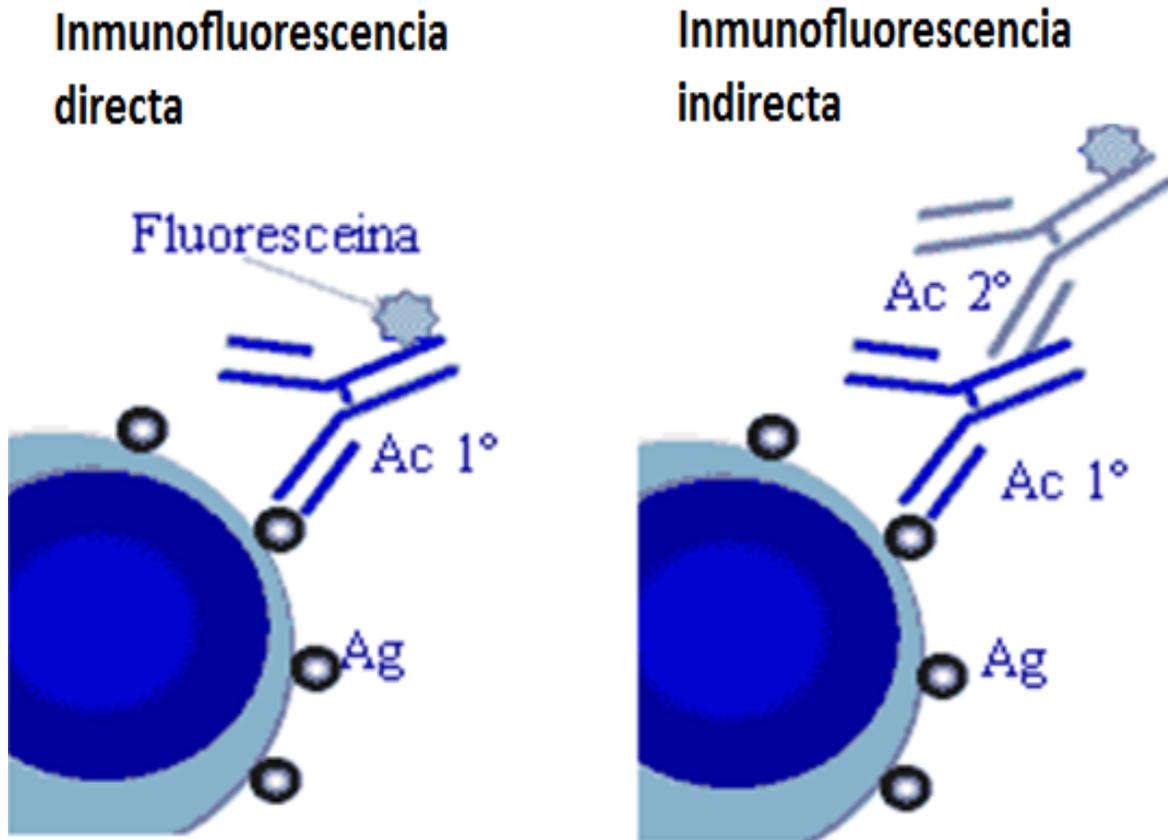
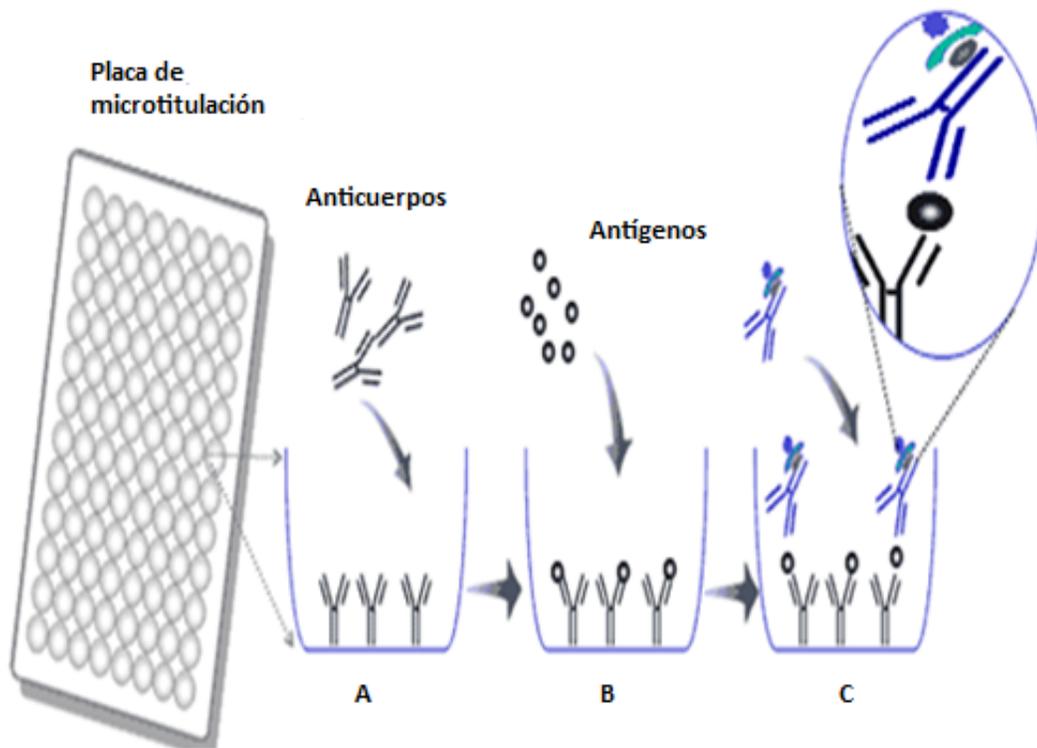


Figura 22. Esquema de Inmunofluorescencia directa e indirecta; fuente: [//www.uco.es/grupos/inmunología](http://www.uco.es/grupos/inmunología)

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Esta técnica, también se conoce como test de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). La identificación de los *complejos Ag-Ac*, se hace mediante el empleo de enzimas, bien unidas al anticuerpo, o bien unidas al antígeno. El test de ELISA puede ser directo o indirecto (sándwich o de captura), constandingo de los siguientes pasos: a) Se tapiza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar. b) Se añade la muestra con el antígeno. c) Se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA.

Técnica de ELISA Directa o no Competitiva

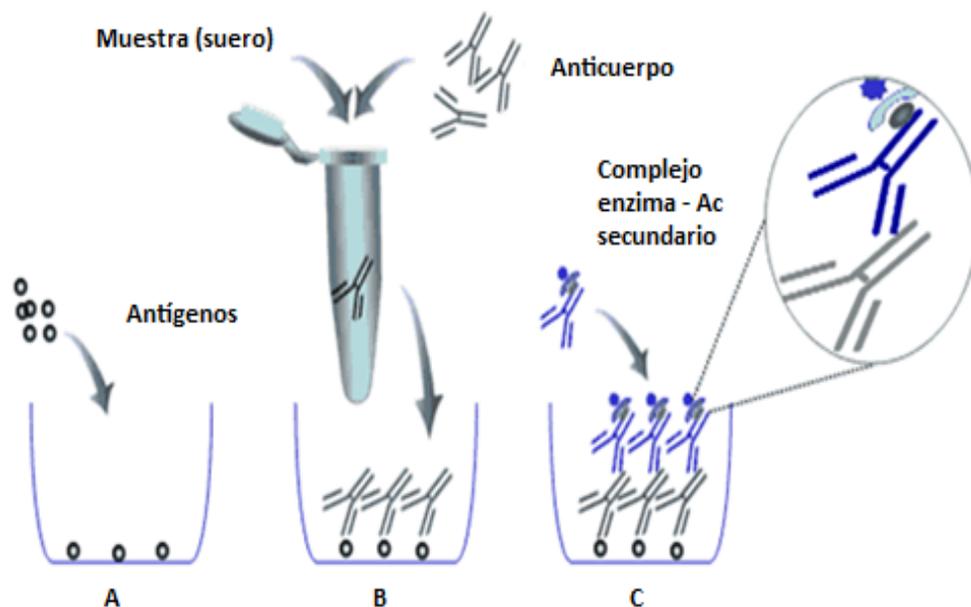


Principio básico de la técnica de ELISA directa o no competitiva:
Se tapiza la placa con el anticuerpo específico frente al antígeno a determinar. Se añade la muestra donde está presente el antígeno que se quiere medir. C

Figura 23. Técnica de ELISA directa; Fuente: [//www.uco.es/grupos/inmunología](http://www.uco.es/grupos/inmunología)

Indirecto o competitivo: Se diferencia del caso anterior en que se añaden los anticuerpos, previamente incubados con la muestra, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos (Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa). Esta técnica se utiliza para la medida de hormonas, antígenos de la hepatitis y otras muchas sustancias que se encuentran a muy bajas concentraciones. Una variante de esta técnica de gran utilidad se conoce como *test en fase sólida* y está orientada a la determinación de anticuerpos frente a un determinado antígeno. Para ello el antígeno se encuentra fijo a un soporte (por ejemplo tubo de plástico). Al añadir la muestra con el posible anticuerpo se unirá y podrá ser detectado añadiendo anti-inmunoglobulinas marcadas con el enzima.

Técnica de ELISA indirecto o competitivo



Principio básico de la técnica de ELISA indirecto o competitivo.

- A. Se fija el antígeno a los pocillos.
- B. Se añade al pocillo la muestra previamente incubada con el anticuerpo primario.
- C. Adición del anticuerpo secundario marcado con una enzima cuyo producto es coloreado.

Figura 24. Técnica de ELISA indirecta; Fuente: //www.uco.es/grupos/inmunología

Si el antígeno se encuentra fijo en células o tejidos. Al igual que hemos visto en el apartado de inmunofluorescencia indirecta, en este caso también se emplean dos anticuerpos. El primero, con actividad frente a los antígenos a estudiar, y el segundo, que va dirigido frente al primero y que actúa de puente con el complejo portador de la enzima. Cuando la enzima es la peroxidasa, este complejo suele ser una peroxidasa-antiperoxidasa (PAP).

Técnica de peroxidasa aplicada a tejidos

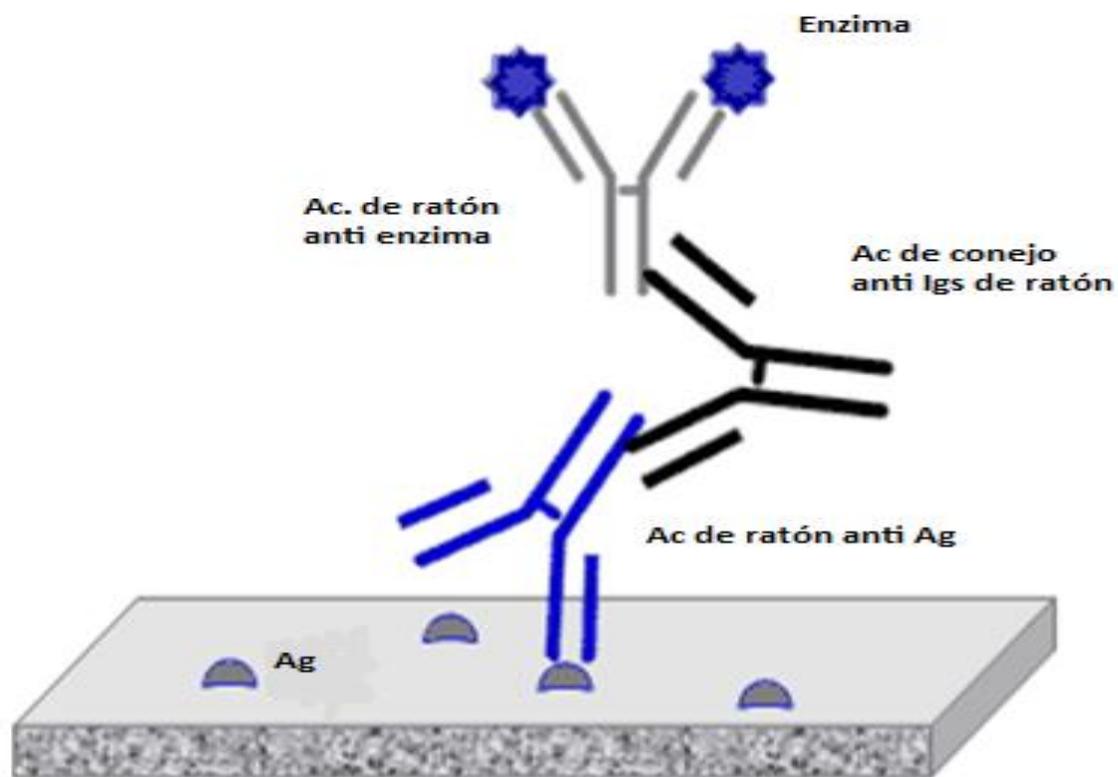


Figura 25. Técnica de Peroxidasa aplicada a tejidos; Fuente: [//www.uco.es/grupos/inmunología](http://www.uco.es/grupos/inmunología)

La diferencia principal entre las técnicas de RIA y ELISA es que la primera utiliza como marcador un isótopo y la segunda la actividad de un enzima, así el RIA directo y el ELISA competitivo serían equivalentes, y también existiría ELISA de inhibición y ELISA en Sandwich. Existen inmunoensayos que se denominan homogéneos en los cuales no es necesario la separación de los inmunocomplejos de los reactivos libres. Son técnicas muchas de ellas patentadas por diferentes firmas comerciales.

PCR (Reacción en cadena polimerasa)

Su fundamento se basa en la replicación del ADN en los organismos realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5'→ 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª Desnaturalización del ADN doble cadena

2ª Hibridación de los iniciadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

3ª Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa

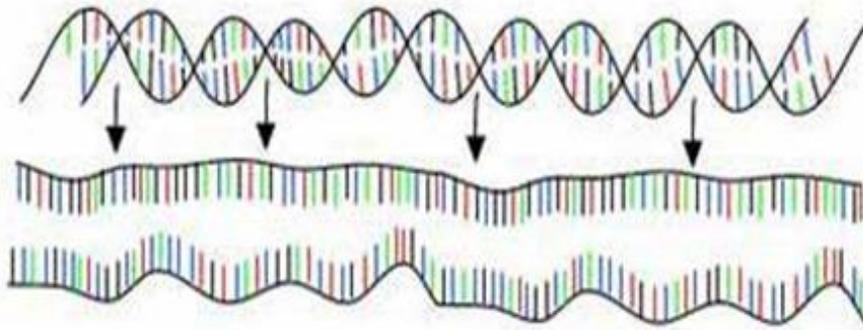
1º etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

2º etapa (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65° C)

3º etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

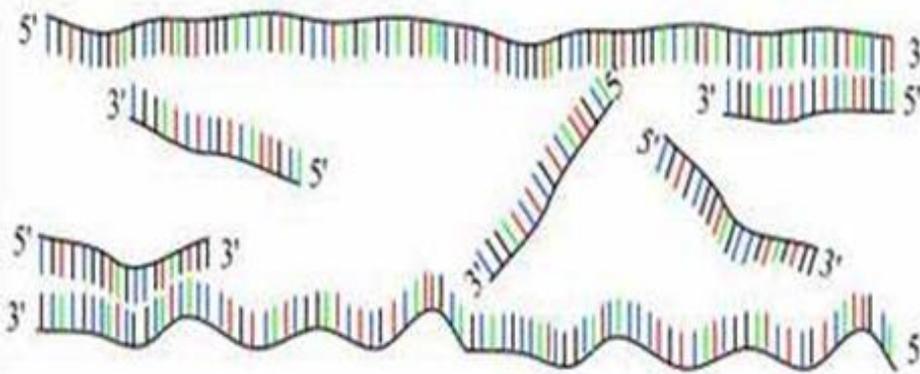
Reacción en cadena de la polimerasa

30-40 ciclos de 3 pasos:



Paso 1: Desnaturalización

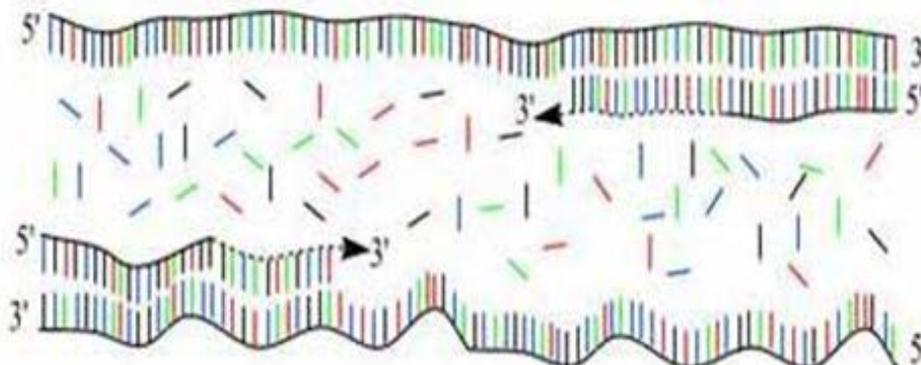
1 minuto a 94°C



Paso 2: Hibridación

45 segundos a 54 °C

!!!Cebadores sentido y antisentido!!!



Paso 3: Extensión

2 minutos a 72 °C

solo dNTPs

Figura 26. Esquema de PCR; Fuente: <http://www.monografias.com/trabajos11/tamau/tamau.shtm>

H) Sistemas Comerciales de Identificación bacteriológica

Los Laboratorios de Microbiología modernos tienen a su alcance una creciente gama de sistemas computarizados para la identificación de los microorganismos y su susceptibilidad a los antibióticos. Algunos de estos sistemas traen consigo programas de computadora para ayudar a evaluar el control de calidad de los mismos. En algunos casos, la computadora hace un control periódico de su funcionamiento mediante comandos u órdenes preestablecidas.

Los sistemas automatizados acortan tiempos de incubación, porque mejoran la sensibilidad analítica de los métodos, es decir, son capaces de detectar el desarrollo bacteriano en una suspensión, con y sin antimicrobianos, antes que el laboratorista pueda detectar turbidez.

Este es el fundamento de los sistemas automatizados de estudio de susceptibilidad, por diferentes métodos (colorimetría, turbidimetría, fluorimetría, etc) detectan el desarrollo bacteriano en micropaneles que contienen diluciones seriadas del antimicrobiano, estableciendo la mínima concentración del antimicrobiano que es capaz de inhibir el desarrollo bacteriano (CMI). La siguiente tabla muestra los diferentes métodos de detección que poseen los distintos sistemas automatizados y sus marcas registradas. (41)

Tabla 19. Sistemas automatizados para identificación y estudio de susceptibilidad bacteriana según el método de detección, marca registrada y fabricante; Fuente: Métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro, P. García C.

Método de detección	Equipo	Fabricante
Colorimetría	Vitek®	bioMerieux
Turbidimetría	MicroScan® Unisept® Pasco® Sceptor® Phoenix®	Dade API DIFCO Becton Dickinson Becton Dickinson
Fluorimetría	Vitek 2® Sensititre® Micro Scan Walk/ Away®	bioMerieux Radiometer Dade

Sistema Vitek (Biomerieux)

El Sistema Vitek utiliza una determinación turbidimétrica de la rapidez de crecimiento del microorganismo, en presencia de agentes antimicrobianos para obtener un análisis de regresión lineal y posteriormente determinar un algoritmo derivado de la concentración inhibitoria mínima (CMI). (37)

Actualmente el laboratorio cuenta con un grupo limitado de tarjetas Vitek. La tarjeta VITEK destinada a la identificación o el antibiograma con los sistemas automáticos VITEK, está lista al empleo. Se presenta en envase unitario, lo cual garantiza una perfecta conservación de los tests hasta el momento de su empleo. Una vez inoculada, se encuentra herméticamente cerrada, y por tanto es manipulable sin riesgo de contaminación. Cada tarjeta de identificación posee 30 pocillos que contienen los substratos bioquímicos en forma deshidratada. No es necesario añadir ningún reactivo, lo cual evita cualquier riesgo de olvido o error. La identificación VITEK cubre más de 300 especies encontradas en el campo de la microbiología clínica e industrial. (40)

Sistema API

La batería de pruebas API20E es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas. Básicamente consta de 21 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta.

La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira. (38)

Tabla 20. Pruebas bioquímicas con las que cuenta el sistema API; Fuente:
<http://perso.wanadoo.es/microdominguez/API.htm>

Pruebas Bioquímicas sistema API

Prueba	Reacción / Enzimas
ONPG	Beta-galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Utilización del citrato
H ₂ S	Producción de H ₂ S
URE	Ureasa
TDA	Triptófano desaminasa
IND	Producción de indol
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)
GEL	Gelatinasa
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa
MAN	Fermentación/oxidación de manitol
INO	Fermentación/oxidación de inositol
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa
OX	Citocromo oxidasa

Tabla 21. Ventajas de los sistemas automatizados de estudio de susceptibilidad bacteriana;
Fuente: Métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro, P. García C.

Ventajas	Especificación
Impacto clínico	Rapidez en el informe de resultado (3-10 hrs vs 16-24 hrs). Inicio o cambio precoz del antimicrobiano. Reducción de costos: días de hospitalización, exámenes de laboratorio.
Estandarización y control de calidad	Aumento de la reproductibilidad intra e inter-laboratorio.
Disminución de la carga de trabajo	Requiere menos personal en métodos que determinan concentración inhibitoria mínima.
Disminución de errores post-analítico	Evita la transcripción errónea de resultados por disponer programas de comunicación bi-direccional.
Utilización de sistemas de expertos	Permite actualizar anualmente las guías CLSI que permite el informe selectivo de los antimicrobianos.
Patrones fenotípicos de resistencia	Permite sospechar la presencia de β lactamasas de espectro extendido y otras β lactamasas.
Facilita la obtención de estadísticas	Capacidad de almacenar y procesar la información para un análisis de tendencias anuales de susceptibilidad.
Facilita el control en el uso de antimicrobianos	Informe de los resultados en línea con la farmacia.

Tabla 22. Desventajas de los sistemas automatizados de estudio de susceptibilidad bacteriana;
Fuente: Métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro, P. García C.

Desventajas	Especificación
Alto costo	El equipamiento y los insumos (paneles o tarjetas) son de alto costo
Requieren método de respaldo	Frente a falla en equipo es necesario disponer de un equipo de respaldo o de una metodología manual de respaldo.
No existen normas CLSI para sistemas automatizados	Sin embargo deben considerarse los métodos empleados (puntos de corte o CIM)
Poca flexibilidad en los antimicrobianos ensayados	Paneles o tarjetas están determinadas por el fabricante. Existen tarjetas especiales pero requieren de un consumo mínimo.
Discrepancia con métodos de referencia	Problemas con algunos fármacos y antimicrobianos: cefepime y <i>Pseudomonas spp.</i> Vancomicina y Enterococcus, imipenem y bacilos Gram negativos no fermentadores.

I) Manejo Seguro de RPBI

Conforme a la NOM-087-ECOL, se considera residuo peligroso biológico infeccioso (RPBI) al proveniente.

- | | |
|--|--|
| -La sangre | -Las muestras para análisis |
| -Los productos derivados de la sangre | -Los cadáveres de animales o partes de estos |
| -Los materiales con sangre | -Los no anatómicos derivados de la atención a pacientes y de los laboratorios |
| -Los antes mencionados, aunque esta o sus derivados se hayan secado incluso el suero y el plasma | -Los tejidos, órganos, partes y fluidos corporales provenientes de necropsias, cirugías o algún otro tipo de intervención |
| -Los cultivos y muestras almacenadas de agentes infecciosos | -Terapias, unidades coronarias y unidades de seguridad biológica o cuarentenas |
| -Los productos biológicos | -El equipo y material contaminado durante la atención a pacientes |
| -Los productos patológicos | -Los equipos y materiales desechables provenientes de exploración, toma de muestras, etc. Tales como: Rectoscopios, otoscopios, espejos vaginales y otros. |

Recomendaciones para un manejo seguro de los RPBI:

- **Aplicar** un modelo o sistema de clasificación homogéneo y homologado a la NOM-087, en toda la unidad o centro hospitalario.
- **Informar y capacitar** correctamente a todo el personal involucrado en el manejo de los RPBI con énfasis en la protección personal para evitar contagios.
- **Utilizar** el equipo de protección personal recomendado para el manejo de los RPBI.
- **Establecer** control y vigilancia estricta y estrecha en el sistema adoptado de almacenamiento temporal de los RPBI, sobre todo de los clasificados como patológicos.
- **Efectuar auditorias** frecuentes a la gestión del manejo de los RPBI.
- **Verificar** que exista señalización y rutas de traslado definidas y conforme a normativas para los RPBI.

En las áreas de generación de RPBI, se deberán separar y envasar, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, considerando lo señalado en la siguiente tabla:

Tabla 23. Clasificación en base a características físicas y biológicas infecciosas de RPBI.

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FÍSICO	ENVASADO	COLOR
Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

EJEMPLOS DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICOS INFECCIOSOS GENERADOS EN LAS ÁREAS MÉDICAS Y SERVICIOS PERIFÉRICOS

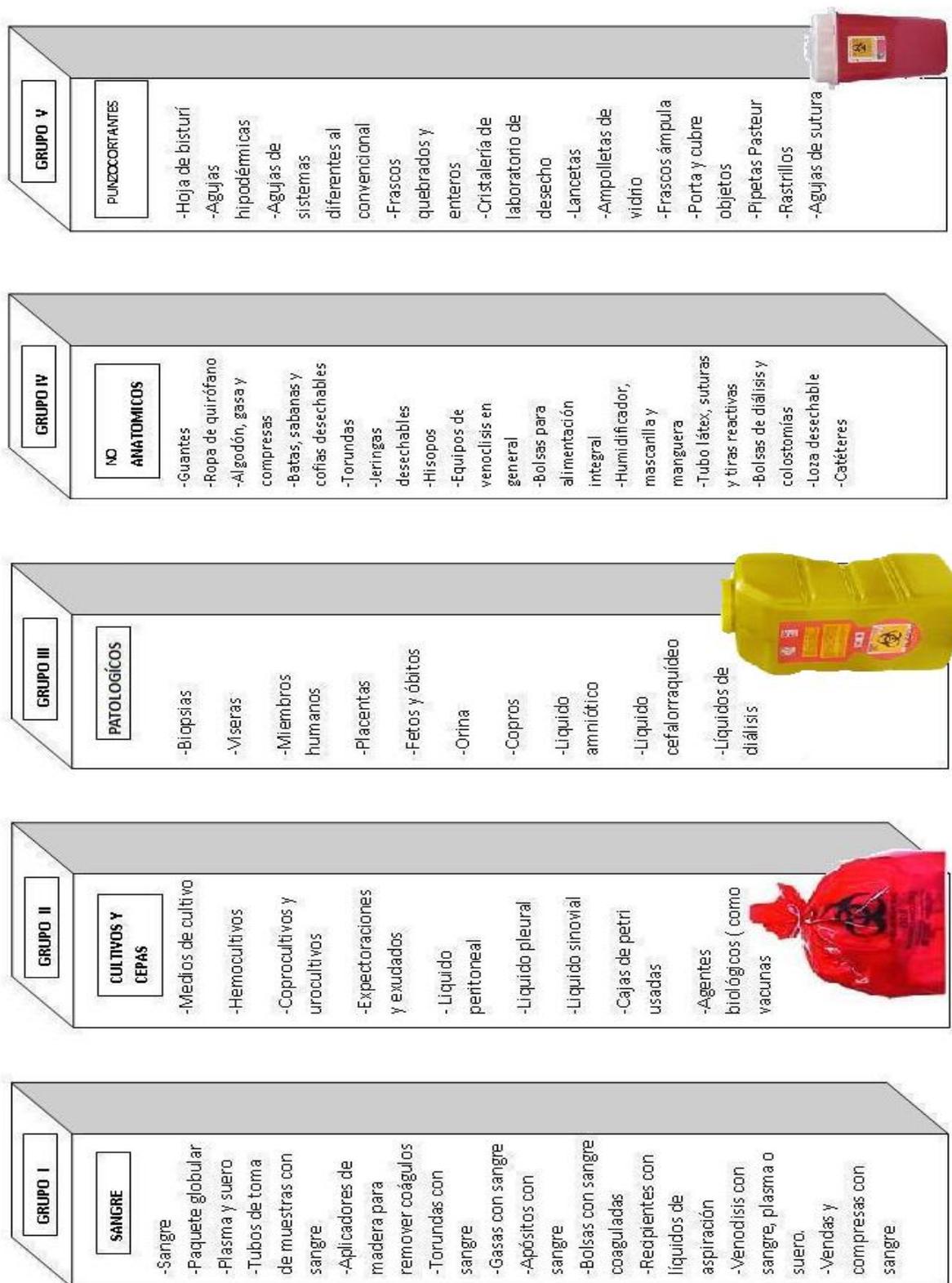


Figura 27. Ejemplos de clasificación de RPBI; Fuente: Basado en la NOM-087 ECOL

8. CONCLUSIONES

Se elaboró un manual práctico de microbiología que apoyará la capacitación de los nuevos profesionales que se desempeñan en esta área, considerando los exámenes de mayor relevancia ordenando información de manera metódica y sintetizada de diferentes fuentes, homogenizando criterios y procedimientos para facilitar el análisis y asegurar la correcta toma y procesamiento de cultivos de muestras biológicas que llevarán en forma consiguiente a correctos y oportunos resultados que apoyen el diagnóstico clínico del paciente.

La fase pre analítica representa una parte esencial de cualquier examen microbiológico y el aislamiento, identificación y otras pruebas dependen de que la toma de muestra se lleve a cabo con la calidad en tiempo y forma ya que cada toma requiere de instrucciones adecuadas y precisas para tener éxito en el diagnóstico.

El homogenizar y actualizar los conocimientos en este campo van a ayudar al profesional que recién ingresa a un área de microbiología y que requiere retomar los conocimientos adquiridos en su formación de manera fácil, sencilla y actual, adecuándose a los métodos, conocimientos, equipos, reactivos y normas de calidad.

El sistematizar los procedimientos de microbiología servirá para incorporar al profesional encargado de esta área a un campo de trabajo sencillo, con calidad y eficiencia siguiendo los diagramas de flujo. Este manual ofrece la posibilidad de tener acceso a una consulta rápida y resumida a técnicas complejas que pueden solucionar sus problemas y cuestionamientos en el momento que lo requieren. En el apéndice podrán encontrar los fundamentos básicos de áreas de conocimiento mínimo para microbiología.

9. REFERENCIAS

1. Bailey and Scott, "Diagnóstico Microbiológico", Undecima edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires 2004.
2. Guillen Prats, "Microbiología Clínica", Editorial Médica Panamericana, España 2005.
3. Elmer W. Koneman et, al "Diagnóstico Microbiológico" Editorial Médica Panamericana, Tercera edición, Buenos Aires 1992.
4. Carlos Gamazo et, al "Manual práctico de Microbiología" Editorial Elsevier Masson, Tercera edición, Barcelona 2005.
5. Edwin Z. Vargas, "Tesis: Manual de control de calidad en Bacteriología clínica del Laboratorio central de análisis clínicos Centro Médico Siglo XXI" Veracruz 2003.
6. Jorge Madrigal Kim et, al "Manual de Bacteriología" Instituto Mexicano del Seguro social, México 1995.
7. José Luis Álvarez, Ma. Del Carmen García, "Manual de enterobacterias" Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
8. G. Ruiz Reyes, A. Ruiz Argüelles, "Fundamentos de importancia clínica de los exámenes de laboratorio" Segunda edición, Editorial Médica Panamericana, México 2010.
9. J.K. Struthers, R.P. Westran, "Bacteriología Clínica", Editorial Masson, Primera Edición, España 2005.
10. Larrosa-Haro A, Ruiz-Pérez M, Aguilar-Benavides S. Utilidad del estudio de las heces para el diagnóstico y tratamiento de lactantes y preescolares con diarrea aguda. Salud Publica Mex 2002;44:328-334. <http://www.insp.mx/salud/index.html>
11. Comunicado IMSS, Marzo 2009 www.imss.gob.mx/NR/rdonlyres/.../0/310309Com110.pdf
12. *Efectividad clínica en la enfermedad diarreica aguda –edad pediátrica-, de Práctica Médica Efectiva, Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud, México 2006.*
www.insp.mx/Portal/Centros/ciss/nls/boletines/PME_04.pdf
13. Efectividad clínica en la enfermedad diarreica aguda (EDA) en adolescentes y adultos, Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud, México 2006.
www.insp.mx/Portal/Centros/ciss/nls/boletines/PME_02.pdf
14. www.scribd.com/.../INFECCIONES-GASTROINTESTINALES
15. Guía para la práctica clínica de las enfermedades diarreicas agudas, Elsie Freijoso Santiesteban, Et al, Rev. Cubana Med Gen Intergr 2003;19(4).

16. www.gefor.4t.com/
17. Características clínico-epidemiológicas de pacientes con cólera en la ciudad de México, Agustina Elena Vilchis-Guizar, Et al, Salud Publica Mex 1999;41:487-491.
18. Aída Jiménez-Corona, et al, El cólera en México situación epidemiológica actual, Dirección General de Epidemiología, Subsecretaría de Servicios de Salud, Secretaría de Salud, Gaceta Médica de México, Vol. 131 No. 3 Mayo-Junio 1995, PP. 363-366.
19. Fernanda Cofre, et al, Faringoamigdalitis Aguda, Departamento de Pediatría y Cirugía Infantil, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y Unidad de Aislamiento, Servicio de Pediatría, Hospital de Niños Dr. Roberto del Río. Rev. Ped. Elec. [en línea] 2005, Vol 2, N° 3. ISSN 0718-0918
20. Guía de Práctica Clínica, Diagnóstico y Tratamiento de Faringoamigdalitis aguda. www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gp...
21. Patrick R. Murray, Microbiología Médica, Sexta Edición, Edit. Elsevier, España 2009.
22. Almeida-Gonzalez et, al, Enfermedad por meningococo, *Neisseria meningitidis*: perspectiva epidemiológica, clínica y preventiva, Salud Publica Méx. 2004;46:438-450. <http://www.insp.mx/salud/index.html>
23. Muestras del Tracto Respiratorio Superior. www.ispch.cl/lab_sal/doc/mues_trac.pdf
24. Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de Streptococcus pneumoniae y Haemophylus influenzae, Manual de Procedimientos, Instituto Nacional de Salud de Colombia. www.salud.gob.mx/unidades/cnts/pdfs/L...
25. www.educa.madrid.org/web/ies.alpajes....
26. Toma, manejo y envío de muestras (INDRE). <http://www.salud.gob.mx/indre/mues.htm>
27. María Antonieta Meseguera, Et al, Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacteriana del tracto respiratorio inferior, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, España, Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2008;26(7):430-6. <http://www.elsevier.es>
28. Norman Rojas, Et al, Bacteriología Diagnóstica, Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, 2008.
29. J. Pemán, Et al, Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica, Primera Edición, Revista Iberoamericana de Micología, España 2001.
30. <http://quimicosclnicosxalapa04.spaces.live.com/>

31. A. Villa, Et al, Utilidad clínica del examen general de la orina en la interpretación de las enfermedades del sistema renal y urinario. *Exopol. Pol. Río Gállego, calle D, Parcela 8, 50840 – San Mateo de Gállego (Zaragoza, España). Urocultivo portal albéitar.*
32. Roberto Rivera-Sánchez, Et al, Etiología de la infección cérvico vaginal en pacientes del Hospital Juárez de México, *Salud pública Méx v.45 supl.5 Cuernavaca 2003.*
33. <http://es.wikipedia.org/wiki/Antiseptico>
34. <http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/inmunologia/tema17/etexto17.htm>
35. <http://www.monografias.com/trabajos11/tamau/tamau.shtml>
36. <http://sarahiviolinist.blogspot.com/>
37. Manual de control de calidad en microbiología clínica
<http://www.monografias.com/trabajos/mmbiologia/mmbiologia.shtml>
38. Sistemas computarizados de identificación bacteriológica
<http://perso.wanadoo.es/microdominguez/API.htm>
39. http://webcd.usal.es/web/educativo/m_especial/recursos.html
40. <http://www.biomerieux.es>
41. Métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro - P. García C., *Rev Chil Infect (2002); 19 (Supl. 2): S 96-100.*
42. Lic. Eric Caballero J., Evaluación microbiológica de la calidad ambiental en instituciones de salud, Junio de 2007. www.revistaciencias.com/.../
43. Q.M. Alicia I. Cuesta, Aseguramiento de calidad, personal, Instalaciones y condiciones ambientales, norma ISO 17025, FAO.
www.rlc.fao.org/es/inocuidad/codex/rla3014/pdf/presen2.pps
44. Control microbiológico de aire, Ingeniería Zwei, [ww.zwei-ingenieria.com.ar/documentos/Zwei-control-microbiologico.pdf](http://www.zwei-ingenieria.com.ar/documentos/Zwei-control-microbiologico.pdf)
45. José Antonio Frías Salcedo, Juan arcos López, Importancia del saneamiento ambiental, procesos de desinfección y esterilización en unidades de terapia intensiva, diálisis y hemodiálisis, quirófanos y central de esterilización. Discusión crítica y recomendaciones para la mejora continua. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología, vol. 27, núm. 4, octubre-diciembre 2007.*

46. Fátima Funes Espinoza, Et al, Bioseguridad y Seguridad Química en Laboratorio, Primera Edición, Diciembre 2005.
47. [http://www. microbiologiaseminario4.blogspot.com/](http://www.microbiologiaseminario4.blogspot.com/)
48. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
49. [http:// www.tecnologiahechapalabra.com/salud/enlaces/...](http://www.tecnologiahechapalabra.com/salud/enlaces/...)