



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”

ALUMNA: ELISA ALMARAZ CORREA

NO. CUENTA: 98217326

AÑO EN QUE TERMINO LA CARRERA: 2006

ORIENTACIÓN: BIOQUÍMICA CLÍNICA

MANUAL: AUTOMATIZACIÓN EN EL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

DIRIGIDO POR:
QFB ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La vida no es fácil para nadie.

¿Y qué importa?

Debemos tener perseverancia

Y confianza en nosotros mismos;

Creer que tenemos un don para algo

Y que ese algo debe ser realizado.

Marie Curie

La voluntad de llegar, las ganas de vencer,

El deseo de usar todo tu potencial,

Estas son las llaves para abrir la puerta

A tu excelencia.

Eddie Robinson

Dedicada a:

Mis padres Alberto y Juana, Mis hermanos, Carlos García y amigos por brindarme su cariño, apoyo, y comprensión durante mi carrera profesional.

Mis profesores que aportaron sus conocimientos en el trayecto.

Agradezco a los profesores:

Alicia Cabrera, Manuel Orduña, Mauro Arrieta, Oscar González, Roberto González, que llevaron a cabo la revisión de la presente tesis

	ÍNDICE	
Introducción		2
Objetivo		2
Planteamiento del Problema		2
Metodología		3
Resultados		4
Análisis de Resultados		106
Conclusiones		107

INTRODUCCIÓN

En apoyo al área de microbiología se pretende complementar los conocimientos adquiridos con este material que contara con los fundamentos y estructura de cada uno de los sistemas y equipos automatizados que existen en el mercado o en laboratorios de microbiología clínica y así mismo aportar la información más importante y valiosa que le permita al egresado desenvolverse con mayor facilidad en el campo laboral.

Es importante poner hincapié que la fuente de desempleo, genera que los egresados de la carrera de Q.F.B y otras ramas dedicadas al área de la salud en microbiología se vean obligados a tener una mayor preparación ya que la competencia que existe en el campo laboral ha ido en aumento en los últimos años. Por tal motivo se pretende proporcionar una herramienta más en la formación y preparación del personal dedicado a la salud, con la elaboración de material didáctico que refiera a la automatización en el laboratorio de microbiología.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el área de microbiología se llevan a cabo pruebas convencionales manuales para la identificación de microorganismos y para conocer la sensibilidad a los antibióticos de estos mismos, por lo que equipos y sistemas automatizados manejados en el laboratorio de microbiología clínica en algunos hospitales no son conocidos en su mayoría por los alumnos del área de la salud.

Es importante que los alumnos y personal de la salud, conozcan los diferentes sistemas y equipos que se emplean en la determinación del grado de sensibilidad que tiene un microorganismo a un determinado antibiótico y tener una visión más amplia en cuanto a la identificación de microorganismos y a la tecnología que se emplea para facilitar el trabajo en el campo laboral, así como conocer sus ventajas, desventajas y el porcentaje de confiabilidad de los equipos y sistemas.

En el laboratorio de microbiología de la FES-Z se identifican algunos géneros con pruebas manuales convencionales microorganismos como los de la familia enterobacteriaceae que bajo ciertas circunstancias puede estar asociado con infecciones o ser el responsable principal de las mismas. La bacteriemia sigue siendo una importante causa de morbi-mortalidad en pacientes críticos, el hemocultivo es el único examen que permite su confirmación. En el laboratorio también se procede a realizar un antibiograma como instrumento diagnóstico de sensibilidad bacteriana y estudios de aislamiento e identificación de hongos causales de micosis superficiales, subcutáneas y sistémicas. Por lo que equipos y sistemas manejados en el laboratorio de microbiología clínica en el campo laboral no son conocidos en su mayoría por los alumnos de esta asignatura.

La falta de experiencia para el diagnóstico de microorganismos en laboratorios de microbiología clínica se debe a la escasez de personal especializado, la mala calidad de los programas educativos y la incapacidad de los laboratorios clínicos para asumir el costo de la capacitación de su personal; por lo tanto, es importante que los alumnos conozcan los fundamentos y estructura de los diferentes sistemas y equipos para tener una visión más amplia en cuanto a la identificación y sensibilidad del microorganismo, la tecnología que se emplea para facilitar el trabajo en el campo laboral, así como conocer sus ventajas, desventajas y el porcentaje de confiabilidad de los equipos y sistemas.

OBJETIVO

Elaborar material didáctico sobre los sistemas y equipos automatizados utilizados en el laboratorio de microbiología, que apoye al módulo de biología médica del noveno semestre de la carrera de QFB, personal del área de la salud y afines.

METODOLOGÍA

Se efectuó una investigación documentada en diferentes fuentes científicas, para obtener la información necesaria que se puede emplear en la elaboración del manual titulado Automatización en Microbiología, que servirá para mejorar el desarrollo académico de los estudiantes del módulo de biología médica de la carrera de QFB, optando por aquella que aporte los datos más relevantes y actualizados de los diferentes equipos y sistemas empleados para el diagnóstico microbiológico, para una correcta identificación del microorganismo a fin de complementar el conocimiento de estos equipos .

La recopilación de la información se obtuvo inicialmente, en libros, artículos de revistas y búsqueda electrónica.

Se procedió al ordenamiento, selección y análisis de la información de las diferentes fuentes bibliográficas para la estructuración de la más completa información para dicho manual que ayudara tanto académica como laboralmente al personal de la salud y a fines.

RESULTADOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES “ZARAGOZA”

CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA



11,12,13

ELISA ALMARAZ CORREA
DIRIGIDO POR: QFB ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ M.

MANUAL DE AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**ÍNDICE**

INTRODUCCIÓN	8
I. Automatización en Microbiología	9
A. Ventajas de equipos automatizados	11
B. Desventajas de equipos automatizados	12
C. El impacto de la automatización	13
1. Impacto clínico	14
2. Impacto Microbiológico	14
3. Impacto Epidemiológico	14
4. Impacto Económico	15
5. Impacto Clínico en el manejo del paciente hospitalizado	16
II. Sistemas automatizados y computarizados de cultivo de sangre.	18
A. El sistema de cultivo de sangre Bact/ALERT.	21
1. Fundamento	21
2. Descripción	21
B. El sistema de cultivo de sangre BACTEC Series 9000, 9240, 9120.	23
1. Fundamento	23
2. Descripción	24
a. Frascos de cultivo Standard Anaerobic/F.	25
b. LYTIC/10 Anaerobic/F	25
c. Frascos de cultivo BACTEC PE-DS PLUS/F	25
d. Frascos de cultivo PLUS Aerobic/F y PLUS Anaerobic/F	26
e. Standard/10 Aerobic/F	26
f. Frascos de cultivo BACTEC Myco/F Lytic	26
C. El sistema de cultivo de sangre vital	27
D. El sistema de cultivo de sangre Disco Extrasensing Power (ESP)	28
III. Sistemas y equipos automatizados para la identificación y sensibilidad de bacterias Gram Negativos y Gram Positivos	32
A. Principios de reacción de los sistemas	32
B. Sistemas de identificación para cocos gram positivos	37
1. API STAPH-IDENT.	37
2. API STAPH.	37
3. ID32 STAPH	38
4. STAF- SISTEM 18-R	38
5. STAPH-ZYM	39
6. SISTEMA RAPI ID 32 STREP	39
C. Sistemas de identificación para enterobacterias	39
1. Sistema RAPID ONE	39
2. Enterotubo II	40
3. MICRO ID	44

D. Sistemas de identificación para bacilos gram negativos no Fermentadores	45
1. RAPID NFT	45
2. Sistema UNINF TEK	46
3. Sistema RAPID NF PLUS	47
E. Sistemas de identificación para bacterias	47
1. Microplacas Biolog GN	47
2. Sistema ID BBL CRYSTAL entérico no fermentador	48
3. MINITEK	50
4. Sistema API 20E Y RAPID NFT (API NFT)	52
5. Sistema RapID NH	54
6. Sistema BactiCard Neisseria	55
7. Sceptor gram-positive MIC/ID panel	56
8. Sistema Sceptor	56
9. Sistemas Sensititre	56
10. Sistema de autoidentificación de gramnegativos sensititre	56
F. Sistemas automatizados de prueba de sensibilidad a antimicrobianos.	57
1. Sistema Vitek	58
2. Tarjeta Vitek gram-positive identification (GPI)	59
3. Vitek gram positive identification card (GPI)	59
4. Sistema microscan walkaway	60
5. Microscan rapid	61
a. Paneles Gram negativos y Gram positivos CIM/Combo	62
b. Paneles Gram negativos CIM/Combo	62
c. Paneles Gram positivos CIM/Combo	63
G. Sistemas de pruebas de sensibilidad comerciales	65
1. Métodos de microdilución en caldo.	65
2. Derivados de la dilución en agar.	66
3. Derivados de la difusión en agar.	66
IV. Sistemas automatizados y computarizados para la identificación y susceptibilidad de levaduras.	69
A. Identificación de levaduras mediante criterios bioquímicos enzimáticos.	69
1. CHROMagar	69
2. Cromogen Albicans	70
3 Candida ID	70
4. Albicans ID2	71
5. CandiSelect	71
6 Agar SDCA-MUAG	71
B. Identificación mediante criterios inmunológicos.	72
1 Bichro-latex Albicans	72
2 Kruseii-color	73
3 Método para identificación de <i>Candida glabrata</i> :	

Rapid Trehalosa	73
4 Identificación Única de enzimas: Diferenciación de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i>	74
C. Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de <i>Candida albicans</i> .	74
1 Sistemas enzimáticos que utilizan sustratos fluorogénicos	74
a. Prueba BactCard para <i>Candida</i> .	74
2 Sistemas enzimáticos que utilizan un sustrato cromogénico	76
a. Murex <i>Candida albicans</i> CA50	76
b. Prueba Murex <i>Candida albicans</i> .	76
D. Identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes	76
1 Sistema Uni-Yeast-Tek	76
2 Auxacolor System	77
E. Identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas	
Y enzimáticas	78
1 Sistema RapID Plus para identificación de levaduras.	78
2 Fongiscreen 4H	79
F. Sistemas semiautomáticos	80
1 Sistema API 20C	80
2 ATB 32C	82
3 Placa bioquímica para levaduras VITEK BIOMERIUX (YBC)	83
G. Sistemas automáticos	84
1 Sistema Vitek 2	84
2 Panel de identificación Rapid Yeast	84
3 Sistema Biolog YT MicroPlate	85
V. Pruebas de susceptibilidad para levaduras	87
A. FUNGI-TEST	87
B. E-Test	88
C. SENSITITRE YEASTONE	90
D. ASTY colorimetric panel	92
VI. Sistemas automatizados para identificación de Micobacterias	96
A. Sistema BACTEC 460	96
B. Sistema de detección de micobacterias MB/Bact.	98
C. Sistema ESP MYCO	99
D. Sistema SEPTI-CHECK AFB	100
E. Tubo indicador de crecimiento de bacterias	101
F. Sistema BD BACTEC™ MGIT™ 960	102
G. Sistema BACTEC 9000 MB	103

INTRODUCCIÓN

Se presenta una investigación bibliográfica de los sistemas automatizados y semiautomatizados utilizados en microbiología clínica para la identificación de microorganismos y a su vez determinar su susceptibilidad de estos ante los antimicrobianos.

En la actualidad la ciencia y la tecnología ha tenido un gran avance en el área de microbiología clínica, y esto ha permitido reemplazar algunos medios de cultivo y las pruebas bioquímicas manuales para identificación de microorganismos por sistemas automatizados y semiautomatizados. Así mismo los sistemas utilizados para la identificación y determinación de sensibilidad a antimicrobianos de agentes etiológicos facilitan llevar a cabo un diagnóstico eficaz a corto tiempo.

Al disminuir el tiempo en obtener un diagnóstico, beneficiara a los pacientes que requieran de éste con suma urgencia y disminuirá el nivel de morbi-mortalidad de ellos. Además disminuye el costo de la enfermedad en pacientes hospitalizados.

En ocasiones los médicos prescriben al paciente medicamentos de amplio espectro que les produce resistencia debido a que no se inhibe o elimina el microorganismo como debiera, ya que las dosis no son las adecuadas o el paciente no siguen la medicación como debiera, por lo tanto, es conveniente llevar a cabo la identificación y determinación de sensibilidad del microorganismo hacia los antimicrobianos por lo que el paciente se administrará el medicamento y la dosis correcta para que ceda la enfermedad.

Esta investigación abarca contenidos como el gran impacto que ha tenido la automatización microbiológica en el paciente, en el laboratorio de microbiología, en la economía, y en la epidemiología, se mencionan las ventajas y desventajas de utilizar los sistemas automatizados y semiautomatizados.

Se proporciona al lector las características generales como su estructura, procedimiento para las pruebas, interpretación, el reporte de resultados y esquema de dicho sistema. Además se menciona el fundamento de cada uno, ya que es de suma importancia, el saber qué es lo que lleva a cabo la identificación del microorganismo.

Cabe mencionar que a pesar de que los sistemas superan a las pruebas manuales no se dejan de realizar del todo estas últimas, ya que al llegar una muestra de un paciente al laboratorio se realizan pruebas directas como las de KOH para la identificación de hongos o se debe obtener un cultivo puro para llevar a cabo el antibiograma. En si se requieren de las bases fundamentales de microbiología aunque se empleen sistemas automatizados y semiautomatizados para el diagnóstico y la identificación del microorganismo.

I. AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

En el diagnóstico microbiológico se están produciendo avances importantes que están permitiendo un diagnóstico más rápido y eficiente. La velocidad en la obtención de este diagnóstico es un aspecto fundamental en la medicina actual, ya que un diagnóstico rápido posibilitará la prescripción de un tratamiento específico que permitirá un uso racional de los antibióticos y limitará el desarrollo de resistencias.¹

Los métodos rápidos y la automatización en microbiología es un campo de estudio dinámico que conjunta la utilización de métodos microbiológicos, bioquímicos, fisiológicos, inmunológicos y serológicos para el aislamiento más efectivo, la detección, caracterización y enumeración más rápida de microorganismos y sus productos en muestras clínicas.

El avance reciente de muchos de los métodos nuevos, ha sido posible gracias a los avances tecnológicos que se han dado en los últimos años tales como los microprocesadores y las computadoras.

Aunque un método rápido pueda ser llevado a cabo en un tiempo muy corto, que puede tardar 10 min, estos métodos siempre partirán de un cultivo aislado o al menos de un medio de enriquecimiento, lo cual alargará el tiempo real del ensayo de 24 a 48 h.²

Dado el incremento en la cantidad de muestras procesadas en el laboratorio, las metodologías convencionales no lograron competir con las ventajas ofrecidas por los sistemas comerciales con respecto a la conveniencia y actualización de las bases de datos.

Los sistemas de identificación disponibles en el comercio reemplazaron en gran parte las compilaciones de los medios de prueba y sustratos preparados en el laboratorio para la identificación bacteriana. Este reemplazo se debió en gran parte a la evolución continua de los sistemas comerciales para maximizar la velocidad y optimizar la conveniencia que puede alcanzarse con los cuatro componentes de identificación mostrados en el cuadro 1.1.

Los sistemas comerciales con frecuencia se clasifican en automatizados o no automatizados. Como se muestra en la tabla 3.1, pueden automatizarse muchos aspectos de un sistema de identificación; esto implica, en su totalidad o en parte, los pasos de inoculación, la incubación y la lectura de las pruebas, así como el análisis de los resultados. Sin embargo, no hay criterios estrictos que establezcan cuántas partes de un sistema completo deben automatizarse para que se clasifique como automatizado. En consecuencia, determinar si un sistema es automatizado puede dar origen a controversias. Además, sin considerar la falta o el nivel de automatización, la selección de un sistema de identificación depende de la precisión y la confiabilidad del sistema, si el sistema satisface las necesidades del laboratorio y respeta las limitaciones impuestas por los recursos financieros del laboratorio. Además de su rapidez y de facilitar el flujo de trabajo, los sistemas automatizados también proporcionan sistemas de manejo de datos computarizados cada vez más poderosos, que pueden usarse para evaluar la exactitud de los resultados, manejan bases de datos más grandes, y proporcionan

una interface con el área de farmacia para aumentar, la utilidad de los datos de las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.³

Como se muestra en el cuadro 1.1 las características de crecimiento, la morfología microscópica y los resultados de las pruebas individuales se utilizan para clasificar la mayoría de los aislamientos bacterianos en grupos generales. Sin embargo la identificación definitiva en cuanto la especie requiere el uso de esquemas diseñados para describir los perfiles metabólicos de los microorganismos.

Los sistemas de identificación por lo común presentan cuatro componentes principales (cuadro 1.1).

1. Selección e inoculación de un conjunto (es decir, batería) de sustratos metabólicos específicos e inhibidores del crecimiento.

2. Incubación para permitir que se utilice el sustrato o que actúen los inhibidores del crecimiento.

3. Determinación de la actividad metabólica producida durante la incubación.

4. Análisis de los perfiles metabólicos y su comparación con los perfiles de especies bacterianas conocidas almacenadas en base de datos para su identificación definitiva.

Algunos de los sistemas más simples de pruebas múltiples presentan un formato convencional en el que una sola inoculación puede brindar más de un resultado. Mediante la combinación de reactantes, por ejemplo, un sustrato puede utilizarse para determinar los resultados de indol y nitrato; los resultados de indol y movilidad; movilidad, indol y ornitina descarboxilasa; u otras combinaciones. Por otra parte, las pruebas convencionales se reunieron en volúmenes más pequeños y se compactaron de modo de inocularse con más facilidad en una sola manipulación en lugar de diversas inoculaciones (p. ej., formato en placa de microtitulación). Cuando se utilizan junto con una base de datos generada por computadora, las identificaciones de especies se realizan con relativa facilidad.

Varios fabricantes producen pruebas bioquímicas convencionales en placas de microtitulación que se envían al usuario congeladas y deben mantenerse así hasta que se descongelen, inoculen y utilicen. De manera alternativa, las placas de microdilución pueden contener sustratos liofilizados que se rehidratan con una suspensión del microorganismo durante la inoculación.

Otro enfoque es utilizar un medio líquido no suplementado en placas de microtitulación a las que se les agregan varios discos impregnados en sustratos antes de la inoculación. Este enfoque permite que el usuario diseñe la serie de pruebas, mientras que en otros formatos las baterías de pruebas están predeterminadas por el fabricante, Los sustratos también pueden estar desecados en cúpulas plásticas dispuestas en serie sobre tiras en las que se coloca una suspensión del microorganismo de prueba. Algunos de estos sistemas que utilizan un inóculo denso o sustratos cuya utilización no depende de la multiplicación bacteriana extensa, permiten disponer de los resultados luego de 4 a 6 horas de incubación.

Se diseñaron incluso otros formatos de baterías de pruebas de identificación para automatizar en forma más completa diversos aspectos del proceso. Un ejemplo es el empleo de "tarjetas" sustancialmente más pequeñas que la mayoría de las placas de microtitulación o las tiras con cúpulas.

De modo análogo al formato de placa de microtitulación, estas tarjetas contienen sustratos desecados en orificios metálicos resuspendidos con la inoculación.³

<p>1. Selección e inoculación de pruebas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La cantidad y el tipo de pruebas seleccionadas dependen del tipo de microorganismo a identificar, la importancia clínica de los aislamientos y la disponibilidad de métodos confiables. • Los sistemas de identificación deben ser inoculados en cultivos puros. <p>2. Incubación para la utilización del sustrato</p> <ul style="list-style-type: none"> • La duración depende de si se requiere multiplicación bacteriana o no para la utilización del sustrato (es decir, prueba basada en el crecimiento vs prueba no basada en el crecimiento.) <p>3. Detección de actividad metabólica (utilización del sustrato)</p> <ul style="list-style-type: none"> • La colorimetría, la fluorescencia o la turbidez se usan para detectar los productos de la utilización del sustrato. • La detección se realiza en forma visual o con la ayuda de diversos fotómetros. <p>4. Análisis de los perfiles metabólicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Implica la conversión del perfil de la utilización del sustrato a un código numérico. • La comparación del código numérico asistido por computadora con base de datos taxonómicas extensas proporciona la identificación más probable del aislamiento bacteriano. • En el caso de microorganismos, en los que la identificación se basa en unas pocas pruebas, por lo común no se requieren en forma sistémica otras pruebas y análisis.
--

Cuadro 1.1 Cuatro componentes básicos de los esquemas y sistemas de identificación bacteriana.³

A. Ventajas de Equipos Automatizados

El uso de paneles comercializados posee diversas ventajas. Entre ellas, destacan la homogeneidad de los reactivos que permite comparar los resultados de diversos laboratorios, la rapidez de manipulación y la disposición de bases de datos computarizados para interpretar los resultados.⁴

Mejor Manejo de especímenes.

Menores riesgos para el personal.

Detección precoz del crecimiento bacteriano

Mayor sensibilidad

Menor contaminación de pruebas

Varios de los sistemas tienen una vida de almacenamiento larga (6 meses a 1 año) de modo que el vencimiento de los medios, un problema particular de los sistemas convencionales, está minimizado.

Los sistemas requieren solo un mínimo espacio para almacenamiento e incubación.

Los sistemas son tanto o más fáciles de usar que los métodos convencionales.

La inoculación es única las reacciones generalmente se cortan a las 24 horas, y la disponibilidad de archivos de registro asistidos por computadora hace que la identificación sea fácil y segura.

Se basan en técnicas estandarizadas y precisas, cuyos resultados reproducibles son iguales o mejores que los procedimientos convencionales.

Menor número de resultados falsos positivos, un incremento significativo de la velocidad de detección y de la tasa de recuperación de microorganismos.

Disminución de la carga de trabajo de un laboratorio (Requiere menos personal, los métodos de determinación de CIM (dilución en agar o dilución o microdilución en caldo) son muy laboriosos cuando se realizan manualmente. La disminución de la carga de laboratorio se debe principalmente a que el tiempo del técnico se concentre en procesar solo los cultivos positivos, en lugar de cargar y descargar instrumentos o subcultivar y observar la mayoría de muestras negativas. Sin embargo, como los cultivos positivos pueden avisar en cualquier momento, se requiere un arreglo del personal para las horas del descanso, dependiendo de los requerimientos de informe de resultados positivos al personal médico.

Disminuye el costo de la enfermedad.

El abreviar el tiempo de respuesta en los estudios de susceptibilidad *in vitro* permite un inicio o un cambio más oportuno de la terapia antimicrobiana, lo que conlleva a una reducción en el número de exámenes, reducción en los días de hospitalización, reducción en el uso de antimicrobianos y se traduce además en una importante reducción de los costos totales.

La fácil inoculación, la capacidad de seleccionar solo las características que van hacer medidas, la manipulación requerida por el agregado de reactivos después de la incubación, la disponibilidad de diagramas interpretativos o bases de datos computarizadas son los principales elementos que deberían considerar los usuarios potenciales antes de seleccionar un sistema. Si se presta estricta atención a las instrucciones provistas por los fabricantes, puede obtenerse el mismo grado de exactitud, confiabilidad de desempeño, con solo diferencias menores en la sensibilidad de las pruebas individuales.^{4, 5, 6}

B. Desventajas de Equipos Automatizados

Gran tamaño de los instrumentos para laboratorios en los que el espacio es un problema.

Elimina la práctica de otras exploraciones complementarias y la aplicación más dirigida de los tratamientos lo que hace del mismo un método nada despreciable, y a veces único, a la hora de plantearse en clínica el diagnóstico etiológico de algunas enfermedades infecciosas.

Una base de datos limitada para algunos sistemas: Algunos de los ensayos rápidos normalmente están dirigidos contra un solo microorganismo y en la mayoría de los casos, se requiere buscar un grupo de microorganismos, lo que provoca una elevación en el costo del análisis final.

Otra dificultad radica en la existencia de una abundancia de ensayos, lo cual hace difícil la selección del más adecuado y también que muy pocos métodos se encuentran validados, lo que hace difícil también su utilización.

La aparición de tecnologías nuevas que en muchas ocasiones requieren de tiempo para estandarizarse.

Requiere laboratorio 24 horas

Requiere servicio técnico

Alto costo: El equipamiento y los insumos (paneles o tarjetas) son de alto costo.

Requieren método de respaldo: Frente a falla en el equipo es necesario disponer de un equipo de respaldo o de una metodología manual de respaldo.

No existen normas CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) para sistemas automatizados: Sin embargo deben considerarse los métodos empleados (puntos de corte o CIM).

Debe señalarse con gran énfasis que, a pesar de la existencia de estos sistemas miniaturizados y automatizados, la utilización de pruebas sencillas realizadas con medios y métodos convencionales preparados en el propio laboratorio y de calidad contrastada, ayudan extraordinariamente a la identificación de las bacterias aisladas con mayor frecuencia en el laboratorio de microbiología clínica.^{4, 5, 6}

C. El Impacto de la Automatización.

Hace más de 20 años que surgió la robótica y la informática en los laboratorios de química y hematología clínica; sin embargo, no fue sino hasta finales de la década de los ochenta del siglo pasado cuando se hicieron los primeros prototipos para microbiología. El efecto esperado en esta área, además de incrementar la confiabilidad, la eficiencia, la rapidez y la productividad, será aumentar la seguridad del personal expuesto a agentes patógenos y por ende adquirir infecciones en el desempeño de sus labores, además de asesorar a los médicos en la toma de decisiones.¹⁰

En el diagnóstico microbiológico se están produciendo avances importantes que están permitiendo un diagnóstico más rápido y eficiente. La velocidad en la obtención de este diagnóstico es un aspecto fundamental en la medicina actual, ya que un diagnóstico rápido posibilitará la prescripción de un tratamiento antibacterial o antifúngico específico que permitirá un uso racional de estos limitando el desarrollo de resistencias.¹

En el comercio se dispone de diversos sistemas de identificación bacteriana para numerosas pruebas para utilizar en los laboratorios de diagnóstico microbiológico; todos tienen en común cuatro componentes de identificación básicos mostrados en la cuadro 1.1. Sin embargo, los diferentes sistemas varían en su enfoque para cada componente. Las variaciones más comunes son:

- Tipos y formatos de pruebas incluidas en la batería de pruebas
- Método de inoculación (manual o automatizado)
- Tiempo de incubación requerido para la utilización del sustrato. Éste por lo común depende de si su utilización requiere crecimiento bacteriano

- Método para detectar la utilización del sustrato y si la detección es manual o automatizada

- Método de interpretación y análisis de los resultados (manual o asistido por computadora) y, si es asistido por computadora, el grado de automatización

Las características generales de algunos sistemas de identificación comerciales se resumen en los siguientes capítulos (tabla 2.1, y 3.1).³

1. Impacto Clínico.

La implementación de estos sistemas, con monitoreo más sensible que el ojo humano, continuo y con agitación constante que acelera el crecimiento de los microorganismos, ha llevado a un tiempo de disminución del tiempo de detección y un aumento de sensibilidad indiscutibles en el diagnóstico microbiológico. La detección precoz a través del rápido aislamiento del agente microbiano responsable es de considerable valor en el manejo de estos pacientes. Esto sin duda lleva un uso más racional de las terapéuticas con antimicrobianos.

Rapidez en el informe de resultado. Inicio o cambio precoz del antimicrobiano. Reducción de costos: días de hospitalización, exámenes de laboratorio.⁹

La utilización de métodos rápidos o automatizados en microbiología, tiene un impacto significativo en el manejo clínico del paciente ya que permite adelantar la decisión de conductas terapéuticas y de aquellas destinadas a un manejo epidemiológico adecuado.

2. Impacto Microbiológico

Ha significado principalmente una disminución de la carga de trabajo, con la posibilidad de procesar grandes volúmenes de muestras. Las técnicas de detección, al no ser invasivas, producen una disminución de la contaminación del laboratorio. Además se amplía el espectro de los microorganismos aislados, sin grandes esfuerzos de subcultivos. Permiten mayor estandarización de los procesos y reactivos. Mejora la bioseguridad dado que disminuyen las posibilidades de corto punzantes.

3. Impacto Epidemiológico

El soporte informático permite obtener con mucha facilidad listados de positividad y negatividad por pacientes, por muestras, por aislados en diferentes sectores del hospital y conocer el rendimiento (%positivos-negativos-contaminantes) que también pueden evaluarse por sección, pacientes o muestras, en forma diaria, semanal, mensual, etc. Esta facilitación del conocimiento continuo y sus variaciones constituyen un gran aporte en el control de las bacteriemias intrahospitalarias.

4. Impacto Económico

En el laboratorio de microbiología: el aumento de costo por botella (2 a 3 veces el costo de las convencionales) se ve ampliamente compensado con la disminución de los costo en materiales de subcultivos de muestras negativas, disminución de accidentes cortopunzantes en operadores reduciendo de esta forma el costo global de hemocultivo. En la institución: deberíamos evaluar que impacto real producen estos sistemas en la disminución de antibióticos de amplio espectro y la disminución de días/cama.

5. Impacto Clínico en el manejo del paciente hospitalizado

Actualmente, en la mayoría de las infecciones el tratamiento antibiótico inicial es empírico: esto significa que el o los agentes antimicrobianos que se administran deben brindar cobertura no sólo sobre el agente que se sospecha que es el causal, sino sobre otros que probablemente puedan producir el mismo cuadro.

Por este motivo, el tiempo que transcurre entre la obtención de las muestras diagnósticas, su procesamiento y sus resultados, es muy importante para poder adecuar el tratamiento empírico inicial.

En los últimos años se han desarrollado y se han difundido la utilización de métodos rápidos y/o automatizados de diagnóstico que han permitido acortar el tiempo de procesamiento de muestras microbiológicas.

¿Ahora bien, en qué medida estos métodos redundan en un beneficio para el paciente hospitalizado? Estos beneficios pueden evaluarse en términos de morbi-mortalidad, reducción de días de internación y en costo de utilización de antimicrobianos.

Barentager y Col. En su estudio publicado en 1999, utilizando el sistema VITEK para identificación y pruebas de sensibilidad de aislamientos bacterianos, demostraron reducciones significativas en términos de tiempo de procesamiento de muestras, duración de hospitalización y costo promedio por paciente. Estos beneficios, destacan los autores, se pueden obtener siempre y cuando el médico instrumente los cambios necesarios en tiempo adecuado, luego de disponer de los resultados.

En el caso de las micobacterias como *M. tuberculosis*, la detección temprana es vital, ya que esto implica no sólo beneficio para el paciente que puede iniciar en forma rápida tratamiento adecuado, sino que permite implementar medidas de control de infecciones más precoces y, de esta forma, evitar que continúe la diseminación de este microorganismo. Así mismo, los métodos rápidos permiten obtener datos de sensibilidad a drogas antituberculosas en forma más temprana que por los métodos clásicos, lo cual en especial en áreas o en situaciones donde se sospecha la presencia de alta resistencia, permite el manejo racional del tratamiento y un mayor control de la diseminación de la resistencia.⁹

RESUMEN

Este capítulo introduce al lector al campo de la automatización en el laboratorio microbiológico. La automatización es una herramienta que ha contribuido a obtener un mejor diagnóstico y tratamiento en pacientes con enfermedades producidas por hongos y bacterias.

En el laboratorio microbiológico se encuentran sistemas automatizados y semiautomatizados, se dice que son en parte automatizados ya que únicamente llevan a cabo la identificación del microorganismo y son en su totalidad automatizados ya que el sistema inocula, incuba e identifica el microorganismo.

Los sistemas presentan ventajas y desventajas por lo tanto es importante seleccionar cual es el más conveniente para utilizar y satisfacer las necesidades del laboratorio, además de ser confiable y preciso.

Finalmente el capítulo refiere al impacto que causan los sistemas en la clínica al disminuir el trabajo, y en el paciente, obteniendo un pronta recuperación y disminución del costo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. José Pontón. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev. Iberoam Micology [revista en Internet] 2002. [Acceso 31 de Mayo 2007]; volumen (19): [pg.25-29]. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/025029.pdf>
2. Heredia Rojas Norma Laura. Taller Automatización en Microbiología Clínica en Latinoamérica. Depto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. [sede web] 2005. [Acceso 31 de Mayo 2007]; [pg.1-2]. Disponible en: http://www.aam.org.ar/actividades/T_AUTOMATIZACIÓN.pdf
3. Forbes A Betty, Sahm Daniel F, Weissfeld Alice S. Diagnóstico Microbiológico. 11ª ed. Madrid España: Médica Panamericana; 2004.
4. Prats Guillem. Microbiología Clínica. España: Editorial Médica Panamericana, S.A; 2006.
5. Patricia García C. Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro. Rev. Chil. Infect. [revista en Internet] 2002; [Acceso 31 de Mayo 2007]; volumen (19) (Supl.2):[pg.96-100]. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v19s2/art06.pdf>
6. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. España: Editorial Panamericana.1999.
7. Finegold Sydney M, Baron Ellen J. Diagnóstico Microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana; 1996.
8. Truant L Allan. Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology. United Status of America: Washington, D.C; 2002
9. Lidia Casimir. Taller Automatización en Microbiología Clínica en Latinoamérica. Depto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. http://www.aam.org.ar/actividades/T_AUTOMATIZACIÓN.pdf
10. Terrés-Speziale Arturo M. Perspectivas en diagnóstico microbiológico. Revista Mexicana de Patología Clínica [revista en Internet] 2002; [Acceso 31 de Mayo 2007]; volumen (49) (No.3): [pg.153-164]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2002/pt023f.pdf>
11. Microsoft Encarta 2007. 1993-2006 Microsoft Corporation.
12. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2007 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Product Center BD BACTEC Instrumented Blood

- Culture Systems [4 páginas]. Disponible en:
<http://www.bd.com/ds/productCenter/BC-Bactec.asp>
13. González G. Gloria M Métodos básicos en el laboratorio de microbiología. Fac. Medicina, UANL.

II. SISTEMAS AUTOMATIZADOS Y COMPUTARIZADOS DE CULTIVO DE SANGRE

Las bacteriemias y las fungemias se diagnostican por hemocultivo, que consiste en el cultivo de una muestra de sangre en medios adecuados para recuperar las bacterias y los hongos que son capaces de crecer en medios artificiales.¹

Clasificación de los diferentes medios de cultivo sugerida por la ASM (American Society for Microbiology):

- I. Para microorganismos aerobios y anaerobios facultativos.
 - a. Medios líquidos.- Infusión cerebro corazón (BHI), Caldo brucella, caldo Columbia, Caldo soya tripticaseína, peptona suplementada.
 - b. Sistemas bifásicos.- Septi-chek (Roche Diagnostics), botellas bifásicas para cultivos de sangre (Becton Dickinson).
 - c. Sistemas de lisis y centrifugación.- Isolator (Wampole Laboratories).
 - d. Medios para utilizarse en sistemas automatizados.- Medios Bactec 6A, 16A, 26Plus, Peds Plus (Becton Dickinson); Medio para aerobios de Bact/Alert (Órganon Teknika).

- II. Para microorganismos anaerobios.
 - a. Medios líquidos.- Medio líquido de tioglicolato, Infusión cerebro corazón para anaerobios.
 - b. Medios para utilizarse en sistemas automatizados.- Medios Bactec 7A, 17A, 27Plus, Lítico (Becton Dickinson); Medio para anaerobios de Bact/Alert (Órganon Teknika).

- III. Medios específicos para la recuperación de hongos.- Isolator y Medio Bactec para hongos.

- IV. Medios específicos para la recuperación de micobacterias.- Bactec 13A, Isolator y Septi-chek AFB.²

Las técnicas de Hemocultivo convencionales son laboriosas y requieren mucho tiempo. En estas épocas de contención de gastos para la atención de la salud y la necesidad de mantener una atención adecuada, se desarrollo instrumentación para los hemocultivos. Los instrumentos pueden detectar con rapidez y precisión microorganismos en las muestras de sangre. Mediante este tipo de instrumentación, los laboratorios que procesan grandes cantidades de hemocultivo también pueden informar los resultados en forma eficaz en relación con los costos. La decisión de comprar un instrumento para hemocultivos es difícil y debe tener en cuenta aspectos como el volumen de trabajo, la población de pacientes y los costos. Más de la mitad de todos los laboratorios de microbiología hospitalarios usan un sistema de hemocultivos automatizado.³

Tabla 2.1 Sistemas de Cultivo de sangre comercialmente disponibles, con monitoreo continuo.⁵

SISTEMA (Fabricante)	Métodos para detección de crecimiento.	Capacidad de los frascos por modulo.	Máximo No. de módulos (No. De frascos ¹) por sistemas.	Ciclo de las pruebas (min)	Tipo de Agitación	Dimensiones (cm)
BacT/Alert 240 (Organon Teknika)	Detección colorimétrica CO ₂	240	6(1,440)	10	(34)	175x87x66
BacT/Alert 120 (Organon Teknika)	Detección colorimétrica CO ₂	120	6 (720)	10	(34)	87x87x55
BacT/Alert 3D (Organon Teknika)	Detección colorimétrica CO ₂	240	12 (2,880)	10	(34)	90x49x61
BACTEC 9240 (Becton Dickinson)	Detección de: CO ₂ , O ₂ ² Fluorescencia	240	5(1,200) (core) 20(4,800) (visión) 50(12,000) (Epi Center)	10	(30)	93x128x55
BACTEC 9120 (Becton Dickinson)	Detección de: CO ₂ , O ₂ ¹ Fluorescencia	120	5(600) (core) 20(2,400) (visión) 50(6,000) (Epi Center)	10	(30)	61x129x56
BACTEC 9050 (Becton Dickinson)	Detección de: CO ₂ , O ₂ ¹ Fluorescencia	50	1(50)	10	Rotación Continua	61x72x6
ESP 128 (Trek Diagnostic System)	Cambio de Presión Manométrica	128	5(640)	12 24	Rotativo (unicamente aerobio) (160)	90x86x65
ESP 256 (Trek Diagnostic System)	Cambio de Presión Manométrica	256	5(1,280)	12 24	Rotativo (unicamente aerobio) (160)	199x86x65
ESP 384 (Trek Diagnostic System)	Cambio de Presión Manométrica	384	5(1,792)	12 24	Rotativo (unicamente aerobio) (160)	199x86x65
Vital (bioMérieux)	Detección de: CO ₂ , O ₂ Fluorescencia	400	3(1,200)	15	Sinusoidal (150)	108x78x114

¹ Únicamente el medio Myco/F Lytic es por detección de O₂.

² Maximo número de frascos acomodados dependiendo de los datos del sistema de administración. (core, Visión o Epi Center).

Tabla 2.2. Características Resumidas de los sistemas de Hemocultivos con monitoreo continuo ³

Sistemas	Fascos Disponibles³	Volumen del inóculo (mL)	Sangre Caldo	Capacidad en frascos/unidades de sistemas	Detección
Bact/Alert	SA Aerobic	5-10	1:4	240 (máx ⁴ =2.160 frascos) ⁵	Detección colorimétrica de CO ₂ .
	SN Anaerobic	5-10	1:4		
	FAN(frascos aerobios y anaerobios)	5-10	1:4		
	FAN Pediatric	1-4	1:5		
BACTEC	Standard aerobic/F	3-10	1:4	240 (máx=1.200 frascos) ⁶ .	Detección por fluorescencia de CO ₂ .
	Standard anaerobic/F	5-7	1:4		
	Plus aerobic/F	3-10	1:2,5		
	Plus anaerobic/F	3-10	1:2,5		
	Peds Plus/F	1-5	1:8		
	Lytic/10 anaerobic /F	3-10	1:4		
	Myco/F Lytic medium	1-5	1:4		
ESP	80 A (aerobias)	10	1:9	384 (máx = 1.920 frascos) ⁷	Detección de consumo de O ₂ o producción de de CO ₂ , H ₂ , N ₂ .
	80 N (anaerobias)	10	1:9		
	EZ Draw 40A	5	1:9		
	EZ Draw 40N	5	1:9		
Vital	Aerobias	10	1:4	Máx= 1.200 frascos ⁸	Detección por fluorescencia de desarrollo.
	Anaerobias	10	1:4		

³ No necesita ventilación en ninguno de los frascos mencionados.

⁴ Máx., número máximo de frascos que pueden procesarse ensamblando varias unidades del sistema.

⁵ Hay instrumentos más pequeños disponibles: Bact/Alert 120 o BACTEC 9120, con una capacidad total de 120 frascos; BACTEC 9050, con una capacidad total de 50 frascos.

⁶ Además del sistema de computación central, existen los sistemas de computación Visión Epicenter, que permiten un máximo de 4800 y 12000 frascos, respectivamente.

⁷ Hay instrumentos más pequeños disponibles: ESP128 frascos; ESP256 con una capacidad total de 256 frascos.

⁸ Hay instrumentos (unidades) más pequeños disponibles: Vital 400, Vital 300 y Vital 200 frascos, respectivamente.

A. El sistema de cultivo de sangre BacT/ALERT

1. FUNDAMENTO

En el sistema de cultivo de sangre se utilizan frascos para cultivo de sangre, cada uno de estos tiene capacidad para recibir 10mL de sangre. Como los microorganismos crecen en una mezcla de caldo y sangre, se libera CO_2 . Este sistema mide los cambios de pH producido por el CO_2 mediante un sensor colorimétrico ubicado en el fondo de cada frasco. El sensor está separado del medio líquido por una membrana que solo es permeable al CO_2 . A medida que los microorganismos se multiplican, liberan CO_2 , que se difunde a través de la membrana y se disuelve en el agua presente en la matriz del sensor. Mientras el CO_2 se disuelve, se generan iones hidrógeno libres. Estos causan un cambio de color en el sensor (de azul a verde claro y amarillo a medida que disminuye el pH) y este cambio de color es leído por el instrumento.^{3,4}

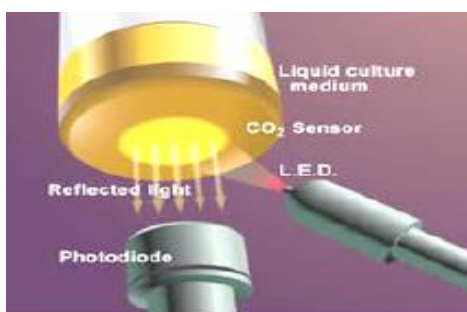


Fig.2.1 Sistema de detección.⁷

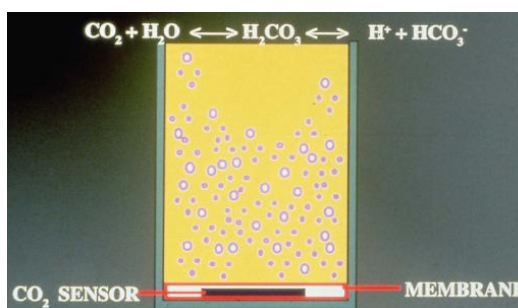


Fig. 2.2. Membrana semi-permeable de silicona⁷



Fig. 2.3 Frascos de Hemocultivo para los instrumentos de hemocultivo con control continuo BacT/Alert.³



Fig. 2.4 Sensor vira desde color verde a amarillo.⁷

2. DESCRIPCIÓN

Cada frasco se coloca con el fondo hacia abajo en un receptáculo en la unidad de datos, sirviéndole de guía un código de barras en la etiqueta de la base, integrada en la computadora para hacer coincidir en cada caso los datos de identificación del paciente.

Cada unidad de datos es un gabinete del tamaño aproximado de un refrigerador pequeño el cual sirve como un auto-incubador, agitador y aparato de detección, con capacidad para mantener 240 o 120 frascos, según el modelo.

Hasta cinco módulos pueden estar unidos a los mismos controles de la computadora, hasta un total de 1.440 frascos que pueden ser monitoreados. Los pocillos se arreglan en dos filas dentro de una gradilla que se mueven suavemente de adelante hacia atrás cuando la unidad de datos está cerrada. Como cada gradilla sostiene 20 frascos, 12 gradillas están contenidas en la unidad de datos de 240 frascos. A intervalos de 10 minutos, un haz de luz emitida por los diodos (una para cada pocillo) se proyecta a través de un filtro de excitación para reflejar el sensor de CO₂ en el fondo de cada frasco. La luz reflejante se dirige a través de un filtro de emisión a un detector fotosensible que, a su vez, está conectado a un compilador en una computadora.⁴

La detección algorítmica de la computadora tiene la habilidad de dar señales cuando hay cultivos positivos.⁵

Tan pronto como la acumulación de CO₂ es suficiente en el frasco para alterar el sensor, se genera una alerta visible o audible, y la posición del frasco positivo es inmediatamente marcada por la computadora. Los frascos positivos pueden eliminarse de inmediato e incluso procesarse.

En cualquier momento puede traerse un grafico a la pantalla de la computadora para monitorear el progreso de la producción de CO₂.⁴

Varias formulaciones de medios son disponibles para uso en el sistema BacT/Alert. Estos incluyen:

a) Estándar anaerobic y aerobic.- medios que contienen 40ml de caldo de soya triptica, tiene la capacidad de recibir hasta 10 mL de sangre por cada frasco.

b) FAN anaerobic y aerobic.- contienen 40ml de caldo de infusión-cerebro-corazón, carbón activado y tierra de batan (Ecosorb), acepta hasta 10 mL de sangre por cada frasco.

c) PF frascos pediátricos que contienen 20mL de medio soya triptica suplementado con infusión-cerebro-corazón sólido, carbón activado y acepta hasta 4mL de sangre. EL PF ha sido vendido para pacientes pediátricos y aquellos pacientes mayores de edad ya que en ocasiones hay dificultad de obtener grandes volúmenes de sangre.

d) MB.- Los frascos de cultivo para sangre MB para la detección de Mycobacteria en sangre ha sido recientemente introducido.⁵



Fig. 2.5. Frascos utilizados en sistema BacT/Alert.⁷



Fig. 2.6 Sistema de Cultivo con control Continuo BacT/Alert.^{3, 5}

Fig. 2.7 Sistema Bact/Alert 3D-(240 celdas) ^{7,16}Fig. 2.8 Sistema Bact/Alert ⁷Fig. 2.9 Sistema Bact/Alert 3D-(240 celdas) ^{7,17}Fig. 2.10 Bact/ALERT unidad de combinación (120celdas) ⁷

B. El sistema de cultivo de sangre BACTEC SERIES 9000 9240 9120

1. FUNDAMENTO

Mide la producción de dióxido de carbono CO_2 de los microorganismos metabólicamente activos.

Estos sistemas usan fluorescencia para medir el CO_2 liberado; un sensor fluorescente permeable a los gases se encuentra en el fondo de cada frasco-ampolla. A medida que el CO_2 se difunde en el sensor, se generan iones hidrogeno (H^+). Estos producen una disminución en el pH que a su vez aumenta el rendimiento fluorescente del sensor. Estos sistemas difieren de todos los demás instrumentos BACTEC en que cada frasco es controlado en forma continua y la detección es externa. Es importante destacar que, al no abrirse los frascos de hemocultivo, se elimina la contaminación cruzada de los cultivos mediante las mediciones repetidas, la necesidad de suministro de gas por separado y el uso de sustratos marcados con ^{14}C . ³

Si existen microorganismos en la muestra inoculada (sangre o los líquidos corporales estériles) en el frasco *BACTEC*, éstos metabolizarán los sustratos presentes en el frasco y producirán CO_2 . La mayor fluorescencia del sensor en el frasco, producida por el aumento del CO_2 , es verificada por el instrumento BACTEC de la serie fluorescente. El análisis del ritmo y monto de aumento de CO_2 hace que el instrumento BACTEC de la serie fluorescente pueda determinar si el frasco es positivo, es decir, que la muestra contiene organismos viables. ⁸

2. DESCRIPCIÓN

El sistema BACTEC consiste en un incubador auto-contenido, agitador y artefacto de detección, similar en apariencia al BacT/Alert.

Hay dos tamaños del sistema BACTEC:

- El modelo 9240 que sostiene 240 frascos
- El modelo 9120 que sostiene 120 frascos, hasta cinco módulos pueden conectarse a la misma unidad de control de la computadora.
- El modelo 9050 que sostiene 50 frascos, por cada unidad incubadora.⁵

La muestra a ser analizada se inocula en uno o más frascos de cultivo que se colocan en el instrumento BACTEC de la serie fluorescente para la incubación y la lectura periódica. Cuando el CO₂ se produce en cada frasco, su sensor emite una luz fluorescente que pasa un filtro; en su camino a un diodo sensible a la luz.

La diferencia operacional entre los sistemas BacT/Alert y BACTEC es que este último usa fluorescencia más que luz espectral para detectar cambios en la concentración de CO₂ en la mezcla sangre-caldo. Los frascos también se ubican con el fondo hacia abajo en los pocillos de recepción y son monitoreados cada 10 minutos, el instrumento verifica el aumento de la fluorescencia del sensor, la que se relaciona con la cantidad de CO₂ presente. El voltaje en la lectura del diodo se compara con la lectura previa. La posición de los frascos positivos se indica en la pantalla de la computadora., y el frasco puede retirarse para un procesamiento adicional. En la pantalla de la computadora, en cualquier momento puede armarse un gráfico del progreso de la producción de CO₂.⁴

Cuando la cantidad de CO₂ incrementa, incrementa la fluorescencia que es detectada por el incremento y es transmitida hacia la computadora.⁵

La forma de la botella de whisky de los frascos de cultivo de sangre, con cuello largo y un excesivo de cabeza, no requiere ventilación con aire atmosférico después de que se establece el cultivo de sangre, una ventaja señalada por los fabricantes por encima del frasco BacT/Alert, que debe ventearse.⁴

La forma de los frascos también permite que la sangre sea extraída del paciente mediante un sistema vacutainer de recolección de sangre, aunque esto no es recomendado por el fabricante por el peligro de un reflujo de sangre en la vena. Todos los frascos para estas formulaciones aceptan 10mL de sangre con excepción de los frascos PEDS/F que son designados para aceptar 1 a 3mL de sangre de infantes, niños y jóvenes.⁵



Fig.2.11. Frascos de hemocultivo para los instrumentos

de control Continuo BACTEC 9240, 9120, 9050. ^{3,8}

Este medio permite identificar bacterias, levaduras y hongos presente: la sangre. Esta línea incluye medios de caldo estándar, medio de resina y m de designado específicamente para inoculación pequeños volúmenes de sang

El medio de resina BACTEC consigue significativamente un grado de aislamiento más alto en pacientes con antibiótico que en sistemas usando solamente caldo de dilución. Esta gran recuperación conduce a un diagnóstico más preciso y a un tratamiento más efectivo, una estancia más corta en el hospital, reducir el costo por antibióticos y estancia en el hospital y en general una gran eficiencia al laboratorio y la institución. ⁸

a. Frascos de cultivo Standard Anaerobic/F.

DENOMINACION

Los frascos de cultivo BACTEC Standard Anaerobic/F (caldo enriquecido prerreducido de digerido de soja-caseína con CO₂) para cultivos anaerobios. Contiene 40mL de caldo de soya triptica.

APLICACION PREVISTA

Método cualitativo para el cultivo y la recuperación de microorganismos anaerobios presentes en la sangre.

Todos los medios BACTEC se suministran con CO₂ añadido. Los medios anaerobios están prerreducidos y se suministran con CO₂ y N₂. La composición puede haberse modificado de acuerdo con las necesidades específicas de rendimiento. ⁹

b. LYTIC/10 Anaerobic/F

DENOMINACION

Los frascos de cultivo BACTEC LYTIC/10 Anaerobic/F (40mL de caldo enriquecido prerreducido de digerido de soja-caseína con CO₂ y a agente lisante.) para hemocultivos anaerobios

APLICACION PREVISTA

Método cualitativo para el cultivo y la recuperación de microorganismos anaerobios presentes en la sangre.

Este medio contiene un agente lisante para incrementar la detección y recuperación de microorganismos particularmente fagocitados por las células blancas de la sangre. ¹⁰

c. Frascos de cultivo BACTEC PE-DS PLUS/F Caldo de digerido de soja-caseína con resinas

APLICACION PREVISTA

Los frascos de cultivo BACTEC tipo PE-DS PLUS/F (caldo enriquecido de digerido de soja-caseína con CO₂) es un método cualitativo para el cultivo y la recuperación de microorganismos aerobios (principalmente bacterias y levaduras) a partir de muestras sanguíneas pediátricas y otras muestras sanguíneas cuyo volumen es generalmente menos de 3 mL.

Los medios BACTEC patentados con resina han mostrado una efectividad neutralizante a una amplia variedad de antibióticos, permite el desarrollo de microorganismos que no ocurriría en un medio convencional.

Este medio es optimizado para pacientes pediátricos. ¹¹

d. Frascos de cultivo PLUS Aerobic/F* y PLUS Anaerobic/F*

DENOMINACION

Los frascos de cultivo BACTEC tipo Plus Aerobic/F (caldo enriquecido de digerido de soja-caseína con CO₂) y tipo Plus Anaerobic/F (caldo enriquecido prerreducido de digerido de soja-caseína con CO₂) para cultivos aerobios y anaerobios. El medio BACTEC Plus Aerobic/F y Plus Anaerobic/F es capaz de soportar el desarrollo al igual de aerobios obligados y de microorganismos facultativos. Contiene 40mL de caldo de soya triptica. Se han formulado para permitir la adición de hasta 10 mL de sangre. La adición de estos volúmenes mayores provoca una detección más temprana y niveles de detección más altos.

APLICACION PREVISTA

Método cualitativo para el cultivo y aislamiento de microorganismos (bacterias y levaduras) en sangre. ¹²

e. Standard/10 Aerobic/F

APLICACION PREVISTA

Los frascos de cultivo BACTEC Standard/10 Aerobic/F (caldo enriquecido de digerido de soja-caseína con CO₂), método cualitativo para el cultivo y la recuperación de microorganismos aerobios (bacterias y levaduras) presentes en la sangre. Contiene 40mL de caldo de soya triptica. ¹³

f. Frascos de cultivo BACTEC Myco/F Lytic (Caldo Middlebrook 7H9 suplementado y caldo de infusión de cerebro y corazón)

DENOMINACION

Los frascos de cultivo BACTEC tipo Myco/F Lytic permiten el crecimiento y detección de microorganismos aerobios.

USO PREVISTO

Cuando se utiliza el medio de cultivo Myco/F Lytic para el cultivo de muestras de sangre, es un medio de cultivo no selectivo diseñado para utilizarse como un complemento a los medios de cultivo de sangre aerobio para la recuperación de micobacterias, levaduras y hongos. Este medio también puede ser utilizado para el cultivo de fluidos corporales estériles cuando se sospecha la presencia de una infección por levaduras u hongos.

La composición puede haberse modificado de acuerdo con las necesidades específicas de rendimiento. Este medio BACTEC se suministra con CO₂ y O₂ añadidos. El medio BACTEC Myco/F Lytic no requiere la adición de un suplemento. Cada frasco de 40 mL de medio BACTEC Myco/F Lytic se recibe listo para su empleo inmediato. La apariencia de los medios cuando son recibidos debe ser transparente y de color ámbar claro. ^{8,14}



Fig. 2.11 Sistema de cultivo de sangre BACTEC 9050 ^{8,5}



Fig. 2.13 Sistema de cultivo de sangre BACTEC 9000.⁸



Fig. 2.12. Sistema de cultivo de sangre BACTEC 9240 ⁸



Fig. 2.14 Sistema de hemocultivo con control continuo BACTEC 9240 ^{8,5}

C. El sistema de cultivo de sangre vital

1. FUNDAMENTO

La particularidad de este sistema es la incorporación de una molécula fluorescente soluble directamente en el caldo de cultivo de sangre y funciona como indicador, para detectar cualquier microorganismo presente en el cultivo. Cuando el CO_2 se acumula en la mezcla caldo-sangre, la molécula detectora fluoresce, lo cual es detectado por un rayo de luz dirigido hacia el centro de cada frasco. La ubicación de un frasco positivo se indica a través de la base de datos de la computadora y pueda ser removida y procesada con facilidad. ²

La molécula fluorescente disminuye su emisión de fluorescencia en presencia de CO_2 , en cambios en el pH o por la modificación de la oxirreducción. ³

Cuando ocurre el desarrollo microbiano; el pH y el potencial redox decrecen en el frasco de cultivo. ⁵

2. DESCRIPCIÓN

Cada unidad de datos está constituida por una cabina que contiene cuatro cajones, dentro de las cuales hay ranuras en los que pueden ubicarse los frascos de cultivo de sangre. ⁴

Existen dos tipos frascos de cultivo:

Vital aerobio

Vital anaerobio

Cada frasco contiene suplemento de caldo de semilla de soya-caseína, cada uno tiene la capacidad de aceptar hasta 10ml. ⁵



Fig.2.15 Frascos de Hemocultivo para Vital ³



Fig.2.16 Sistema de hemocultivo con control continuo Vital. ^{3,5}

D. El sistema de cultivo de sangre Disco Extrasensing Power (ESP)

1. FUNDAMENTO

El crecimiento es detectado por monitoreo de un cambio de presión de gases dentro de cada frasco (H_2 , O_2 , CO_2 , N_2), son unos u otros consumidos o producidos por metabolización del microorganismo. ⁵

Este sistema se basa en la producción de CO_2 que es monitoreada por manometría. Los cambios en las concentraciones de H_2 y O_2 son detectados además de los cambios en la de CO_2 . Tanto la producción y el consumo de gas es monitoreado.

El consumo de oxígeno se acelera en el momento en que los microorganismos que se están replicando pasan a la fase logarítmica de crecimiento. Por lo tanto, puede hacerse una lectura temprana en el periodo de incubación, antes de que se produzca una cantidad detectable de CO_2 .

Esta es una ventaja distintiva del sistema ESP, porque las lecturas habitualmente se hacen a las 8 horas antes que en los sistemas que sólo detectan CO_2 y porque se detectan microorganismo asacarolíticos que tal vez nunca produzcan suficiente CO_2 como para activar el indicador. ^{3,4}

2. DESCRIPCIÓN

La unidad de datos es un gabinete que sirve como un incubador autocontenido, agitador y detector, tiene unidades con capacidad de 128 o 384 frascos que están siempre disponibles, aunque más de un módulo puede unirse al sistema de computación central. Después de inocular hasta 10ml de sangre venosa, cada frasco es provisto de un conector descartable que incluye también a una aguja que penetra el septo que sirve de tapón. Luego, cada frasco se coloca en una posición definida en la gradilla portadora, de tal forma que el conector se una directamente al sensor de prueba ubicado en el tope de cada posición. Una vez que el frasco ha sido alineado en forma apropiada la posición de la cabeza de gas se monitorea en forma continua. Durante una fase de consumo H_2 y O_2 puede realizarse una lectura. ⁴

Existen dos tipos frascos de cultivo. ESP aerobic: constituido por caldo caseína de soya-peptona, estos permanecen en agitación orbitalmente a 160rpm y ESP anaerobic: contiene por caldo de proteasa peptona. Los frascos no son agitados. El monitoreo de los frascos cada 12 minutos para frascos aeróbicos y cada 24 minutos para frascos anaerobios, el cambio de presión son trazados junto a la producción de la curva de crecimiento. ⁵



Fig. 2.17 Sistema de Hemocultivo con control continuo. ESP ^{3,5}



Fig. 2.18 Frascos de Hemocultivo para el instrumento control continuo ESP Culture System II de Trek Diagnostic Systems. ³

RESUMÉN

La presencia de hongos y bacterias en sangre producen enfermedades infecciosas graves que al no ser detectadas a tiempo son terminales, por lo tanto la detección e identificación del microorganismo en sangre son de gran importancia en el laboratorio microbiológico.

El diagnóstico de la bacteriemia y la fungemia se genera mediante el cultivo de sangre (hemocultivo). A su vez se utilizan sistemas semiautomatizados y automatizados que conllevan a la agitación, incubación y detección del desarrollo microbiano con rapidez y precisión.

La detección de los microorganismos es a través de la colorimetría de CO_2 , la fluorescencia, detección de consumo de O_2 o producción de CO_2 , H_2 , N_2 .

El personal del laboratorio debe tener conocimientos para identificar microorganismos patógenos de los contaminantes. Se pretende evitar que si el cultivo presenta contaminación, el paciente lleve un tratamiento y sigan realizando pruebas de laboratorio, y costos hospitalarios innecesarios, aunque el agente identificado sea causa de contaminación de la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prats Guillem. Microbiología Clínica. España: Editorial Médica Panamericana, S.A; 2006.
2. García del Valle Araceli, Zamudio Durán Mercedes. Manual de Biología Médica. México D.F: UNAM FES-Zaragoza; 2006.
3. Forbes A Betty, Sahm Daniel F, Weissfeld Alice S. Diagnóstico Microbiológico. 11ª ed. Madrid España: Médica Panamericana; 2004.
4. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. España: Editorial Panamericana.1999
5. Truant L Allan. Manual of Comercial Methods in Clinical Microbiology. United Status of America: Washington, D.C; 2002
6. Finegold Sydney M, Baron Ellen J. Diagnóstico Microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana; 1996.
7. Biomerieux [sede Web]. U.S.A: BIOMÉRIEUX, INC; 2003 [fecha de actualización: 2005 [acceso: 28 de Enero de 2008] BacT/Alert 3D Technology Automated Microbial Detection System [6 páginas]. Disponible en: <http://industry.biomerieux-usa.com/industry/bloodbank/index.htm>
8. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2007 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Product Center BD BACTEC™ Instrumented Blood Culture Systems [4 páginas]. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/productCenter/BC-Bactec.asp>
9. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2006 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Package Insert *Standard Anaerobic/F Culture Vials* [12-13paginas]. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/pkgInserts.asp#PF1>
10. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2004 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Package Insert BACTEC Litic10/AnaerobicF. [11-13paginas]. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/pkgInserts.asp#PF1>
11. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2006 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Package Insert PEDS PLUS./F Culture Vials [pag.12-15]. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/pkgInserts.asp#PF1>
12. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2006 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Package Insert Plus Aerobic/F* and Plus Anaerobic/F* Culture Vials [pag. 11-14]. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/pkgInserts.asp#PF1>

13. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2006 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Package Insert Standard/10 Aerobic/F Culture Vials [pag.11-13]. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/pkgInserts.asp#PF1>
14. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2006 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Package Insert *Myco/F Lytic Culture Vials Supplemented Middlebrook 7H9 and Brain Heart Infusion Broth* [pg. 21-25]. Disponible en <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/pkgInserts.asp#PF1>
15. Biomerieux [sede Web]. U.S.A: BIOMÉRIEUX, INC; 2003 [fecha de actualización: 2003 [acceso: 20 de Mayo de 2007] BacT/ALERT 3D Software for Routine Microbial Testing and Data Exchange; fecha de [2 páginas]. Disponible en: http://industry.biomerieux-usa.com/industry/bloodbank/bact_alert3d/bact_alert3d_overview.htm
16. Biomerieux [sede Web]. U.S.A: BIOMÉRIEUX, INC; 2003 [fecha de actualización: 2003 [acceso: 20 de Mayo de 2007] BacT/ALERT3D with Select The Software Solution When Space and Staff Are at a Premium; [2 páginas]. Disponible en: <http://industry.biomerieux-usa.com/industry/index.htm>

III. SISTEMAS Y EQUIPOS AUTOMATIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD DE BACTERIAS GRAM NEGATIVOS Y GRAM POSITIVOS

Los paneles de pruebas metabólicas miniaturizadas incluyen en pequeños pocillos de plástico una mínima cantidad del medio de identificación o del sustrato a estudiar liofilizado o desecado. Éste se rehidrata con un pequeño volumen de una suspensión de la bacteria a identificar en agua destilada o en medio de cultivo y se llevan a incubar. Estas galerías suelen incluir de 10 a 50 pruebas.

También existen paneles o galerías de este tipo que son procesados por instrumentos que efectúan la inoculación, la incubación y la lectura de modo automatizado, evaluando los resultados una computadora que efectúa la identificación. Todos los paneles comercializados deben manipularse y leerse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Existen diferentes paneles dirigidos a la identificación de los distintos grupos microbianos, como enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, estafilococos, estreptococos, neisserias, bacilos corineformes y bacterias anaerobias.²

A. Principios de reacción de los sistemas

Fermentación de carbohidratos (GLU, SUC, SOR, RAF, RHA, ARA, INO, ADO, MEL): la fermentación de un carbohidrato específico resulta en la formación de ácido. La baja resultante de pH se identifica por el indicador de rojo de fenol.

Urea (URE): la enzima ureasa divide las moléculas de urea dando lugar a la formación de amoníaco. El incremento resultante de pH se detecta por el indicador rojo fenol.

Sulfuro de hidrogeno (H_2S) a partir de tiosulfato de sodio se produce sulfuro de hidrogeno gaseoso que reacciona con los iones férricos del medio para producir un precipitado negro.

Indol (IND): el metabolismo de triptófano da lugar a la formación de indol, que se detecta con la adición del reactivo de Kovac si hay producción de indol se desarrolla un color rojo.

Lisina, Arginina, Ornitina, (LYS, ARG, ORN): la descarboxilación de estos aminoácidos resulta en la formación de aminas básicas, las cuales son detectadas por el indicador púrpura de bromocresol.

Triptófano desaminasa (TDA): bacterias capaces de desaminar el triptófano, producen ácido indol pirúvico que reacciona con el citrato férrico amónico del medio y el cloruro férrico produciendo un color marrón.

Hidrólisis de la esculina (ESC): La hidrólisis de la esculina se detecta por el citrato férrico amónico del medio que reacciona con los productos hidrolíticos para formar un precipitado negro.

Voges-Proskauer (VP): a partir de piruvato sódico se produce acetoína la cual es indicada por la aparición de un color rojo al añadirse hidróxido potásico 40% y alfa-naftol 5%.

Galactosidasa (ONPG): la beta galactosidasa hidroliza el orto-nitrofenil-beta-D-Galactopiranosido que libera orto-nitrofenol de color amarillo.

Citrato, malonato, acetamida, tartrato (CIT, MAL, ACE, TAR): el utilizar estos sustratos como la única fuente de carbono para el metabolismo resulta en un incremento de pH que se detecta mediante el indicador azul de Bromotimol.

Oxidación- Fermentación (OF/G): la oxidación de glucosa resulta en la formación de ácido. El descenso de pH puede detectarse mediante indicador azul de bromotimol.

Nitrato (NIT): la reducción de nitrato a nitrito se detecta por la formación de un color rojo después de añadir ácido sulfanílico 0.8% y N, N-dimetil-alfa-naftilamina 0.5%

Cemitrida (CET): la tolerancia a la cemitrida se demuestra por el crecimiento en caldo Mueller- Hinton suplementado con cemitrida

Penicilina, Kanamicina, Colistina, Cefalotina, Nitrofurantoina, tobramicina (P₄, K₄, Cl₄, Cf₈, Fd₆₄, To₄): resistencia a concentraciones específicas de estos antimicrobianos se demuestra con crecimiento.

Cristal violeta (CV): Crecimiento en presencia de concentraciones bajas de cristal violeta, se usa para distinguir entre estreptococos (positivos) y estafilococos (mayormente negativos).

Separador de Micrococos (MS): Crecimiento en presencia de concentraciones bajas de bacitracina (0.05µg/ml) se usa para distinguir estafilococos (positivos) de micrococos (negativos).

Novobiocina (NOV): algunos estafilococos se caracterizan por ser resistentes a bajas concentraciones (1.6 µg/ml de novobiocina)

Glucosidasas (PGR y PGT): la habilidad de un microorganismo de producir una enzima glucosidasa específica, se detecta por la ruptura del complejo carbohidrato nitrofenil liberando nitrofenol, el cual es amarillo en color.

Indoxil fosfatasa (IDX): la hidrólisis de indoxil fosfato mediante la indoxil fosfatasa, produce un componente azul insoluble. La mayoría de los estafilococos coagulasa y DNasa positivos son IDX positivos.

Optoquina sensibilidad a la optoquina es característica de *Streptococcus pneumoniae*.

Otros estreptococos y estafilococos no son inhibidos por la optoquina.

Fosfatasa (PHO): la fosfatasa alcalina rompe las moléculas del p-nitrofenil fosfato produciendo fosfato inorgánico y p-nitrofenol el cual es color amarillo

Esculina bilis (BE): organismos capaces de crecer 40% bilis y de hidrolizar la esculina se detectan por la producción de un precipitado negro, resultado de la reacción del producto hidrolítico esculetina con citrato férrico. El grupo estreptococos D, algunos *Streptococcus viridians* y algunos estafilococos son BE positivos.

Pirrolinodil-β-naftilamida (PYR): organismos que producen pirrolinodasa rompen la L- pirrolinodil- β-naftilamida en L- pirrolidona y β-naftilamina, la cual combina con el reactivo peptidasa (p- dimetilaminocinnamaldehído) para producir un color rojo

Arginina (ARG): La deshidrolización de la arginina resulta en la alcalinización del medio, lo cual se detecta por el cambio de color amarillo a rojo en el indicador rojo fenol.

Carbohidratos (RAF, LAC, TER, MNS, SOR, ARA, RBS, INU, MAN): la fermentación de un carbohidrato específico, resulta en la formación de ácido. La consiguiente baja de pH se identifica por el indicador de rojo de fenol, el cual se torna amarillo.

6.5% NaCl (NACL): La tolerancia al cloruro de sodio 6.5% se demuestra con crecimiento. La tolerancia salina, se usa para distinguir enterococos y no-enterococos.

Bacitracina (BAC): La sensibilidad a bajas concentraciones de bacitracina es indicada por la ausencia de crecimiento y es característica de *Streptococcus pyogenes*.

Piruvato (PRV): El uso de piruvato resulta en la formación de ácido. La baja de pH resultante, se detecta mediante el indicador rojo fenol, el cual se torna amarillo.

B-Lactamasa (BL): La presencia de B-Lactamasa se puede demostrar añadiendo Yodo y penicilina al pocillo BL. La ruptura del anillo B-Lactámico forma puntos de aglomeración más competitivo por el yodo que por moléculas de almidón. Si hay B-Lactamasa presente, el yodo se adhiere al anillo B-Lactámico y ocurre una reacción incolora. Si no hay B-Lactamasa presente, el todo se combina con las moléculas de almidón dando un color azul oscuro-negro.

Hemólisis (HEM): Las estreptolisinas S y O producidas por los estreptococos causan una lisis parcial o total de los hematíes que contenga agar sangre de cordero.^{1, 2, 3}

TABLA 3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SISTEMAS DE IDENTIFICACIÓN COMERCIALES ¹

Producto	Microorganismos identificados	Formato	Inoculación	Utilización de sustrato, crecimiento y ausencia de crecimiento (tiempo para los resultados)	Método de Detección	Análisis de resultados e interpretación
Sistemas API, diversos productos (bioMérieux)	Bacilos gram negativos, Estafilococos, Estreptococos, Otros cocos gram positivos, Corinebacterias y otros Bacilos gram positivos	Cúpulas o microtubos en tiras de plástico	Manual	Crecimiento y ausencia de crecimiento (2-72 h, de acuerdo con el tipo de microorganismo)	Colorimétrico, Fluorescencia y Turbidez (todos manuales)	Libro de códigos asistidos por computadora o respuesta telefónica computarizada
BBLCrystal (Becton Dickinson Microbiology Systems)	Enterobacteriaceae, otros bacilos gram negativos, Cocos gram positivos, Especies de Neisseria, Especies de Haemophilus	Microplaca modificada	Manual	Crecimiento y ausencia de crecimiento (3-20 h, de acuerdo con el tipo de microorganismo)	Colorimétrico fluorométrico (manual)	Libro de códigos asistidos por computadora
BBL Minitek (Becton Dickinson Microbiology Systems)	Enterobacteriaceae, Otros bacilos gram negativos, Especies de Neisseria, Otros gram positivos	Placa de micotitulación con discos impregnados en el sustrato	Manual	Crecimiento (4-48 h, de acuerdo con el tipo de microorganismo)	Colorimétrico (manual)	Libro de códigos
BBL Enterotube (Becton Dickinson Microbiology Systems)	Enterobacteriaceae, Otros gram negativos	Cámaras con sustrato	Manual	Crecimiento (18-48 h, de acuerdo con el tipo de microorganismo)	Colorimétrico	Libro de códigos
GN-GP Microplate (Biolog)	Bacilos y cocos gram negativos, Bacilos y cocos gram positivos	Placa de micotitulación	Manual	Crecimiento y ausencia de crecimiento (4-24 h)	Colorimétrico (automatizado)	Análisis de los resultados dirigidos por computadora

Micro-ID (Becton Dickinson Microbiology Systems)	Enterobacteriaceae, Otros gram negativos	Cámaras con sustrato en tiras plásticas	Manual	Ausencia de crecimiento (4 h)	Colorimétrico (manual)	Libro de códigos asistidos por computadora
ID rápida, diversos productos Innovative Diagnostics	Enterobacteriaceae, y otros bacilos gram negativos Neisseria y Haemophilus, Estreptococos, Enterococos y otros cocos gram positivos	Placas autoinoculables con orificios con sustratos para la reacción	Manual	Ausencia de crecimiento (2-4 h)	Colorimétrico (manual)	Libro de códigos asistidos por computadora y compendio electrónico
Vitek (bioMérieux)	Enterobacteriaceae, y otros bacilos gram negativos Estreptococos Enterococos Otros bacilos gram positivos Estafilococos	Tarjetas con orificios diminutos	Automatizada	Crecimiento (2-18 h)	Colorimétrico (automatizado)	Automatizado, asistidos por computadora
MicroScan (Dade International)	Enterobacteriaceae, y otros bacilos gram negativos Estafilococos Estreptococos Enterococos Otros bacilos gram positivos Especies de Haemophilus Especies de Neisseria	Placa de micotitulación	Manual	Crecimiento y ausencia de crecimiento (2-42 h, de acuerdo con el tipo de microorganismo y el sistema de sustrato utilizados)	Colorimétrico, Fluorescencia (manual o automatizado)	Automatizado, asistidos por computadora y libro de códigos

B. Sistemas de identificación para cocos gram positivos

1. API STAPH-IDENT.

El API Staph-IDENT utiliza una batería de 10 pruebas bioquímicas miniaturizadas sembradas con una suspensión densa del microorganismo por identificar.

La identificación a nivel de especie está dada por la obtención de un número código de cuatro dígitos calculado a partir de las pruebas positivas de la tira y de la base de datos. Es posible que se requieran pruebas adicionales (por ejemplo producción de ácido a partir de xilosa, susceptibilidad a la novobiocina) para identificar algunas cepas. Actualmente la base de datos incluye 17 especies o subespecies de estafilococos, micrococos y *Stomacoccus mucilaginosus*. Los microorganismos denominados *S. mucilaginosus* por el Staph-IDENT requieren confirmación: las recomendaciones incluyen la susceptibilidad a la lisostafina para diferenciar al microorganismo de los estafilococos y las pruebas de catalasa y desarrollo en caldo con sales para diferenciarlo de *M. kristinae*. El Staph-IDENT ha sido ampliamente evaluado y la concordancia con los procedimientos convencionales ha variado del 43 al 95% según la especie probada. El Staph-IDENT es inadecuado para identificar tanto a las especies más frecuentes como a las más infrecuentes de la familia Micrococcaceae.^{3 16}

2. API STAPH.

El API STAPH es un sistema de identificación en 18-24 horas a 35-37°C para micrococos y estafilococos que contiene sustratos deshidratados que se reconstituyen por la adición de una alícuota a cada tubo de este sistema.

Este sistema consta de 19 pruebas acomodadas sobre una tira que se siembra con una suspensión del microorganismo preparada en un medio líquido con peptona y extracto de levadura provisto con el equipo.

Después de leer las reacciones bioquímicas se genera un código de 7 dígitos y la identificación del microorganismo se obtiene con la ayuda de la base de datos de una computadora. Esta consta de 25 taxones e incluye estafilococos de origen humano y veterinario, especies de micrococcus y *Stomacoccus mucilaginosus*.

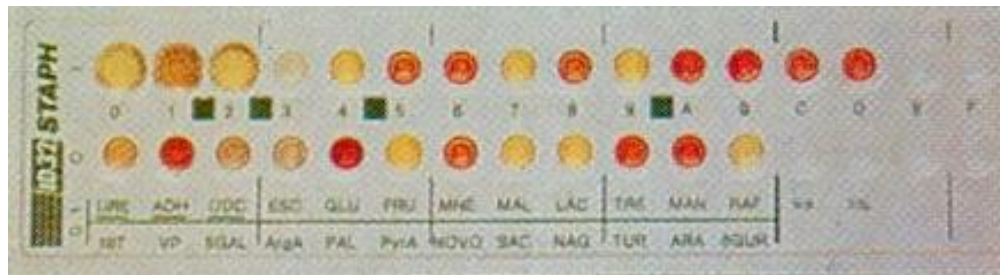
Sustratos: D-Glucosa, D-Fructosa, D-Manosa, Maltosa, Lactosa, D-Trehalosa, D-Manitol, Xilitol, D-Melibiosa, Nitrato de potasio, Rafinosa, Xilosa, Sucrosa, metil-D-glucosidasa, N-acetyl-glucosamina, Arginina, Urea, Piruvato de sodio, Naftil-ácido-fosfato.^{3,4, 5, 6}

Fig.3.1 Sistema API STAPH¹⁵

3. ID32 STAPH

El ID32 STAPH es un sistema de 24 horas en una tira que se usa para la identificación de las micrococáceas que contiene 32 cúpulas y actualmente consta de 26 pruebas bioquímicas, con lugares para ampliar la batería de pruebas. El sistema puede ser leído en forma manual para generar un número de perfil que se interpreta por una base de datos asistida por una computadora. Como alternativa, la galería puede ser utilizada con el sistema automatizado BioMerieux ATV que incluye un densitómetro un sembrador, un aparato de lectura, una microcomputadora y una impresora. El ID32STAPH posee la base de datos más extensa de todos los sistemas e incluye todas las especies de estafilococos de origen humano (excepto *S. saccharolyticus*) y varias especies animales y del medio ambiente. Este sistema también identifica seis especies de micrococos y *S. mucilaginosus*.

Este sistema todavía no ha recibido la aprobación de la FDA y por lo tanto no está disponible para su uso en los laboratorios clínicos de los EU. (3,4, 6)

Fig.3.2 Sistema ID32 Staph³

4. STAF- SISTEM 18-R

El Staf-Sistem 18-R consiste en una placa de plástico que contiene 18 sustratos convencionales modificados. Las cubetas se siembran con una suspensión de microorganismos mediante una pipeta multicana y el panel se incuba y se lee después de 18 a 24 horas. Piccolomini y Col, evaluaron este sistema con 523 cepas pertenecientes a 16 especies humanas de staphylococcus y encontraron que 491 cepas habían sido correctamente identificadas, mientras que otras 28 cepas requirieron pruebas adicionales para su identificación. Como sucede con muchos de estos sistemas en equipo los autores señalan la necesidad de corregir la base de datos y de una selección de pruebas más

discriminatorias para identificar correctamente aislamientos importantes como *S. lugdunensis* y *S. schleiferi*.³

5. STAPH-ZYM

El Staph-Zym es un nuevo sistema de identificación escandinavo que está compuesto de una tira de plástico con 10 minitubos que contienen sustratos cromógenos y convencionales deshidratados. Cada microtubo se siembra con una alícuota de suspensión bacteriana preparada en solución fisiológica y los resultados se leen después de una noche de incubación. Este sistema ha sido evaluado en lo que respecta a su capacidad para identificar aislamientos de estafilococos humanos.³

6. SISTEMA RAPID ID 32 STREP

Este sistema de identificación con formato de galería de 32 pruebas para estreptococos y bacterias similares a estreptococos. Su base de datos es muy extensa e incluye los estreptococos agrupables, varias especies de Enterococos y los *Streptococcus viridans* (incluso las especies de descripción reciente como el grupo mutans de estreptococos orales, *S. oralis*, *S. gordonii* y *S. vestibularis*).

Se prepara una suspensión de la bacteria a identificar en agua destilada, de turbidez equivalente a estándar 4 de Mc Farland, y se agregan 55 µL de esta suspensión a cada una de las 32 cúpulas. La galería se incuba a continuación entre 35 y 37°C durante 4 horas y se lee manualmente utilizando un libro de códigos o con el lector automático.^{3, 4,6}



Fig.3.4 Sistema RAPID ID 32 STREP. Esta tira fue sembrada con una cepa de *Streptococcus viridans S. salivarius*.³

C. Sistemas de identificación para enterobacterias

1. SISTEMA RAPID ONE (Innovative Diagnostics Systems)

Es un micrométodo cualitativo que emplea sustratos convencionales y cromogénicos para la identificación de enterobacteriaceae médicamente importantes y otras bacterias seleccionadas gramnegativas, oxidasa negativas aisladas de muestras clínicas humanas.

El sistema comprende 1) los paneles RapID onE, 2) reactivo RapID onE. Cada panel RapID onE tiene 18 cavidades de reacción moldeadas en la periferia de una bandeja descartable de plástico.

Las cavidades de reacción contienen reactivos deshidratados, y la bandeja permite la inoculación simultánea de cada cavidad con una cantidad predeterminada de inóculo. Se emplea una suspensión del microorganismo prueba en 2mL del fluido RapID de inoculación como inóculo prueba, la cual se rehidrata y se inicia la reacción de prueba. Los paneles inoculados se ubican en la bandeja de inoculación provista por el paquete y se incuban entre 35°C y 37°C en un incubador sin CO₂ durante 4 horas.

Los paneles RapID onE contiene 18 cavidades de reacción que proporcionan 19 anotaciones de prueba. Las pruebas rotuladas PRO, GCT, PYR (cavidades 15, 16, 17) requieren del reactivo RapID onE y están diseñadas con un recuadro dibujado alrededor de las pruebas. La prueba 18 es bifuncional, contiene dos pruebas separadas en la misma cavidad. Esta prueba se anota antes de la adición del reactivo, y proporciona el primer resultado de la prueba, que es adonitol; luego se adicionan dos gotas del reactivo indol INOVA Spot a la cavidad 18 y la misma cavidad se vuelve anotar después de la adición del reactivo para proveer el segundo resultado de la prueba, que es indol. Los 19 resultados de las pruebas más oxidasa se anotan y se genera un código perfil de siete dígitos.

El microorganismo ID se obtiene encontrando el código perfil en el compendio de códigos RapID onE.⁴



Fig.3.5 Sistema RapID onE⁴

2. ENTEROTUBO II (Becton Dickinson Microbiology Systems)

Los sistemas requieren poco espacio y el riesgo de contaminación está minimizado. Las reacciones de color en general son fáciles de interpretar; existen problemas menores en la diferenciación de la elevación de la capa de glucosa (como un indicador en la producción de gas) a partir de la pérdida de medio durante el almacenamiento.

También puede ocurrir una interpretación falsa negativa si una diminuta pérdida en el plástico permite el escape de gas que se forma. El reactivo de indol y voges proskauer deben agregarse con una aguja y jeringa a través del delgado plástico trasero. Si no se hace cuidadosamente, el reactivo agregado se puede

derramar en otros compartimientos, lo cual alterara las reacciones. Por lo tanto, se recomienda que las reacciones en otros compartimientos sean interpretadas antes del agregado de los reactivos.

Una desventaja adicional para el Enterotubo II, comparado con otros sistemas que usan sustratos secos, es que la incorporación de medios de agar convencionales acorta la vida de estante.

El fabricante proporciona un sistema de identificación de códigos adecuadamente computarizados (CCIS) que lista las posibles identificaciones bacterianas por un número biotípico de cinco dígitos que se deriva de la interpretación de cambios de color.^{3,8}

Sustratos: Glucosa, Gas en cámara de dextrosa, Lisina descarboxilasa, Ornitina descarboxilasa, Sulfuro de hidrógeno, Indol (añadir reactivo de Kovac a la cámara de H₂S), Lactosa, Fenilalanina (añadir FeCl₃, 10%), Dulcitol (leer en la cámara de fenilalanina), Ureasa, Citrato.⁸

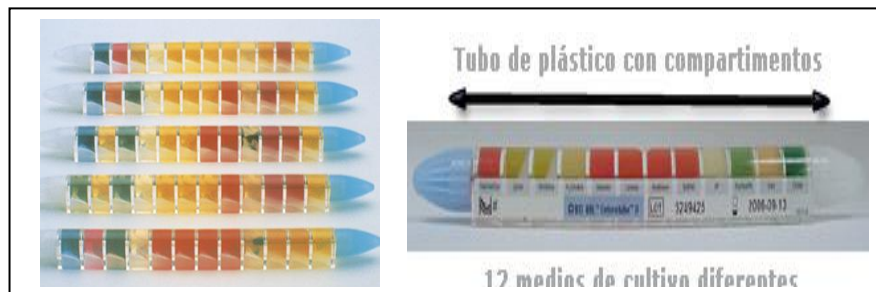


Fig. 3.6 ENTEROTUBO II (Becton Dickinson Microbiology Systems)^{8, 9, 16}



Fig. 3.7 Retirar las dos tapas. La punta de la guía de inoculación se encuentra debajo de la tapa blanca. No someter al calor la guía.



Fig. 3.8 Seleccionar una colonia bien aislada directamente con la punta de la guía de inoculación BBL Enterotube II. Se debe observar una cantidad visible de inóculo en la punta y en el costado de la guía. No tocar el agar con la guía.

AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA



Fig. 3.9 Inocular el Enterotube II primero retorciendo la guía y luego retirando la guía por todos los compartimientos y aplicando un movimiento giratorio.



Fig. 3.10 Volver a insertar la guía (sin esterilizar) en BBL Enterotube II, utilizando un movimiento giratorio en todos los compartimientos, hasta que la muesca de la guía se alinee con la abertura del tubo. La punta de la guía debe estar visible en el compartimiento de citrato. Cortar la guía en la muesca mediante torsión.

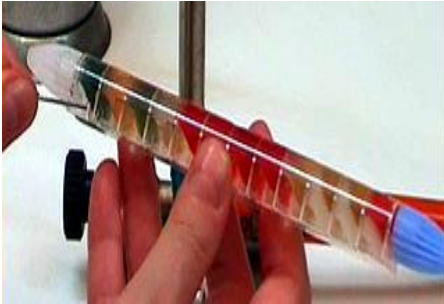


Fig. 3.11 Con la parte restante de la guía, hacer orificios a través del papel metalizado que cubre las entradas de aire de los últimos ocho compartimientos (adonitol, lactosa, arabinosa, sorbitol, Voges-Proskauer, dulcitol/PA, urea y citrato) para favorecer el crecimiento aerobio en estos compartimientos. Volver a colocar las tapas.



Fig. 3.12 Incubar a 35 o 37 °C durante 18 - 24 h sobre una superficie plana o en posición vertical. Permitir la circulación de aire entre los tubos incubados. Efectuar la interpretación y registrar todas las reacciones con excepción de indol y Voges-Proskauer. Se debe efectuar la lectura de todas las demás pruebas antes de realizar las pruebas de indol y Voges-Proskauer, puesto que los reactivos añadidos a estas pruebas pueden alterar las demás reacciones de BBL Enterotube II.

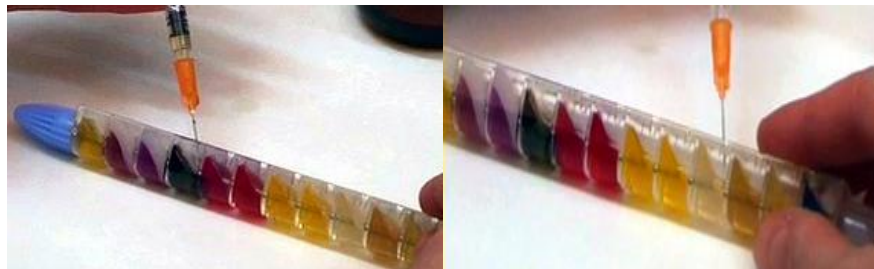


Fig. 3.13 Adición de los reactivos Indol y Voges-

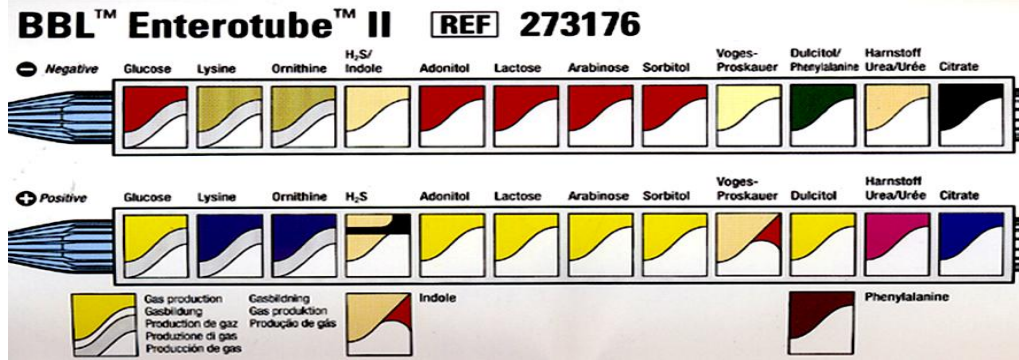


Fig. 3.14 Interpretación de resultados de Enterotubo II

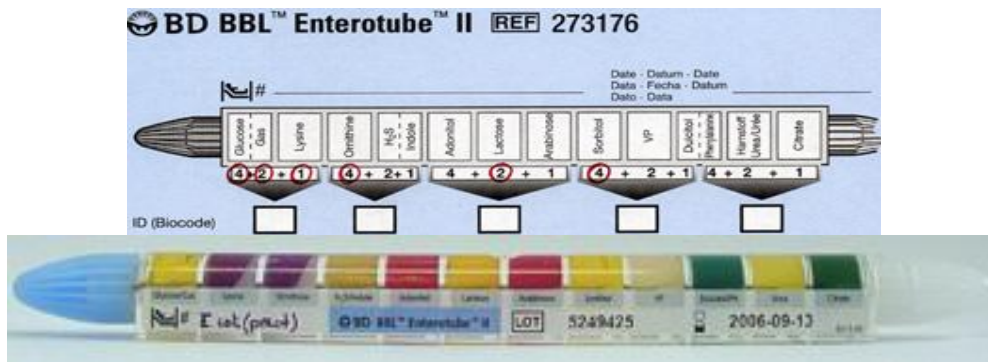


Fig. 3.15 Vista delantera de Enterotubo II

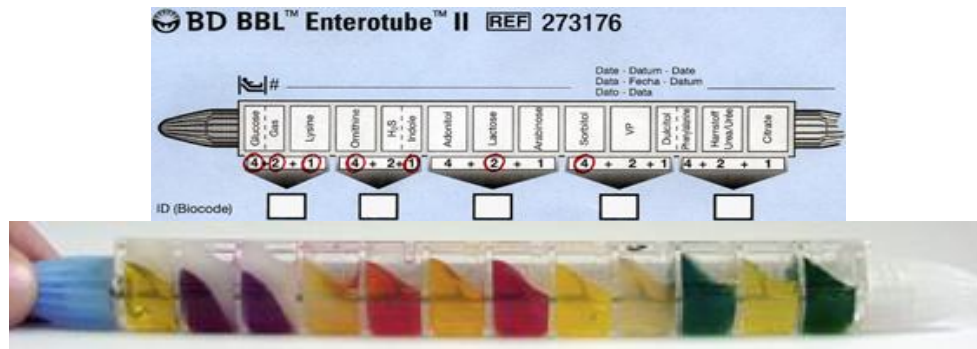


Fig. 3.16 Vista trasera tras revelar indol y VP de Enterotubo II



Fig 3.17 RESULTADOS ENTEROTUBO II (Becton Dickinson Microbiology Systems) ^{8, 9, 16}

3. MICRO ID (Remel, Lenexa KS)

MICRO ID es un sistema de identificación de bacterias en 4-6 horas. La inoculación del sistema es relativamente fácil, y las unidades ocupan poco espacio durante la incubación y almacenamiento. Con una pipeta se deposita una suspensión bacteriana dentro de cada cámara de reacción seguida de una incubación por 4 horas a 35°C. Solo es necesario agregar un reactivo (hidróxido de potasio al 20%) a una de las cámaras antes de interpretar los resultados. Las reacciones son distintas y pueden compararse con una guía en color. El fabricante proporciona un registro de perfil que lista las probables identificaciones del microorganismo por el número biotípico de cinco dígitos y pueden hacerse comparaciones por computadora para buscar el que coincide mejor. La certeza es igual o excede la de otros sistemas comerciales.^{3,8}

Sustratos: Voges-Proskauer, Reducción de Nitrato, Fenilalanina, H₂S Indol, Ornitina descarboxilasa, Lisina descarboxilasa, Malonato, Ureasa, Hidrólisis de Esculina, ONPG, Arabinosa, Adonitol, Inositol, Sorbitol.⁸

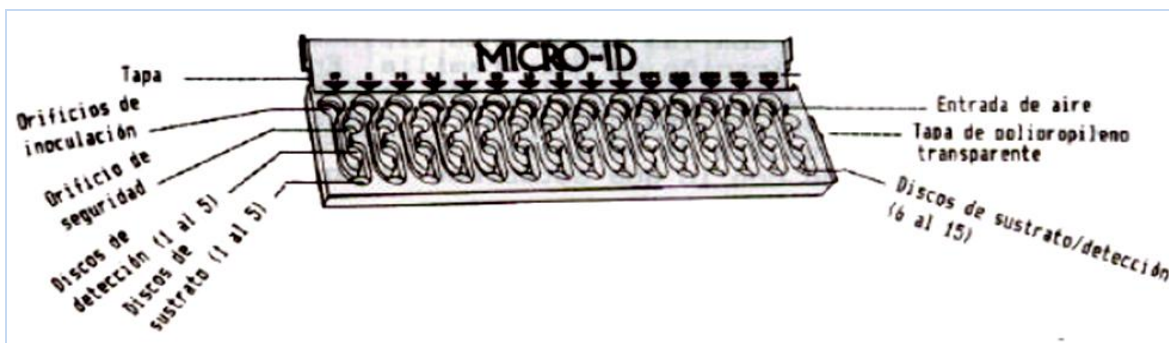


Fig 3.18 Sistema Micro-ID^{3, 7, 9}

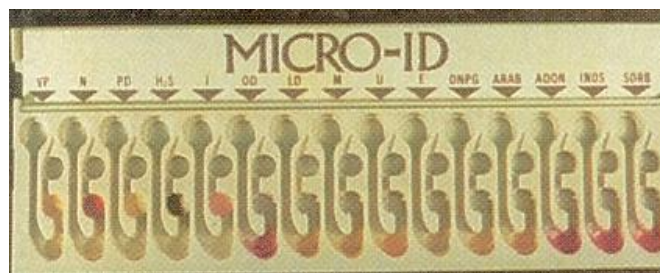


Fig 3.19 Sistema Micro-ID^{3, 7, 9}

MICRO-ID® ENCODING FORM <small>See Package insert and identification Manual for Detailed Instructions.</small>							9410991		DATE							
							SPECIMEN IDENTIFICATION									
TESTS	VP	N	PD	H.S	I	OD	LD	M	U	E	ONPG	ARAB	ADON	INOS	SORB	
NUMERICAL <small>(Sum of Positive Results)</small>	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
TEST RESULTS	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
SUM OF POSITIVE VALUES <small>(in each group of three reactions)</small>	4			1			1			2			1			
ORGANISM IDENTIFICATION:																
Comments:																

© ORGANON TEKNIKA, 1996 Printed in USA July 1996 ORGANON TEKNIKA CORPORATION Box 1999 Durham, North Carolina 27709-0199

Fig 3.20 Test de resultados Sistema Micro-ID 3, 7, 9

D. Sistemas de identificación para bacilos Gram negativos no fermentadores

1. RAPID NFT

Con una pipeta pasteur, llenar la porción tubular de las primeras ocho galerías (desde NO₃ hasta PNPG) con la suspensión bacteriana. Sembrar una ampolla de medio AUX con cuatro gotas de la misma suspensión. Mezclar bien. Con una pipeta pasteur estéril o nueva sembrar las pruebas de asimilación GLU a PAC (galerías con líneas de color, llenando los tubos y las cúpulas hasta obtener una superficie líquida sin menisco).

Agregar vaselina líquida a las galerías de GLU ADH y URE. Incubar la tira durante 24 horas a 29-31°C. Después de 24 horas agregar los reactivos para nitratos a la galería NO₃ y el reactivo TRP a la galería TRP. Leer y registra las reacciones. Las pruebas de asimilación se consideran positivas si hay desarrollo visible en la porción de la cúpula de la galería. Se calcula un número de perfil de siete dígitos. Si no se obtiene una buena identificación o si el número de perfil no se encuentra en el libro de códigos, la tira puede incubarse 24 horas más. Para hacerlo, cubrir inmediatamente las galerías NO₃ y TRP con vaselina líquida. Registrar los resultados de las pruebas NO₃, TRP y GLU después de 24 horas; no leer estas pruebas después de 48 horas.

Sustratos incluidos:

- Pruebas bioquímicas: Reducción de nitratos, triptofanasa, fermentación de glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa, hidrólisis de la esculina, gelatinasa, beta galactosidasa.

- Prueba de asimilación: D-Glucosa, L-Arabinosa, D-Manosa, D-manitol, N-Acetil-D-Glucosamina, maltosa, D-gluconato, Caprato, adipato, L-malato, citrato y fenilacetato.³

2. SISTEMA UNI/NF TEK para la identificación de no fermentadores.

Este sistema consiste de dos tubos con medio en pico de flauta y una rueda que incluye doce compartimientos periféricos y uno central que contienen una variedad de medios con sustratos.

Los dos tubos se utilizan para descartar *P. aeruginosa*. El tubo sin constricción se incuba a 42°C para observar desarrollo y producción de proscianina; el tubo con constricción se utiliza para determinar fluorescencia, fermentación de glucosa y N₂.

La rueda se utiliza para determinar varias características bioquímicas. Cada uno de los compartimientos periféricos con medio de cultivo posee un pequeño orificio a través del cual puede sembrarse la suspensión bacteriana. El medio del compartimiento central está en contacto con el aire y se inocula directamente. Una tapa de plástico cubre el conjunto para evitar la evaporación durante la incubación.

Procedimiento.

Sembrar inicialmente por punción los dos tubos, utilizando una asa recta con la que se haya tomado la superficie de una colonia bien aislada de la bacteria en estudio, desarrollada en medio sólido. Incubar los tubos durante 18-24 horas a 35°C.

Si las reacciones de los dos tubos no son compatibles con *P.aeruginosa*, preparar una suspensión densa de bacterias emulsificando todo el desarrollo del pico de flauta del tubo GNF en 2 ml de agua destilada estéril. Agregar una gota de suspensión a cada uno de los compartimientos periféricos a través del orificio de siembra e inocular profundamente por punción el medio sólido del centro de la rueda. Colocar nuevamente la cubierta de plástico sobre la rueda e incubar el conjunto a 35°C durante 18 a 24 horas. Las reacciones de color se leen visualmente y las identificaciones se hacen utilizando un esquema lógico o programa de computadora suministrado por el fabricante.

Sustratos incluidos: agar en pico de flauta del tubo sin constricción (desarrollo a 42°C y producción de proscianina). Tubo con constricción (medio GNF, fermentación de la glucosa, N₂, fluorescencia). Rueda (compartimiento periféricos, control de desarrollo, glucosa, xilosa, manitol, lactosa, acetamida, esculina, maltosa, urea, DNasa, ONPG, compartimiento central, medio sólido, sulfuro de hidrogeno e indol).³

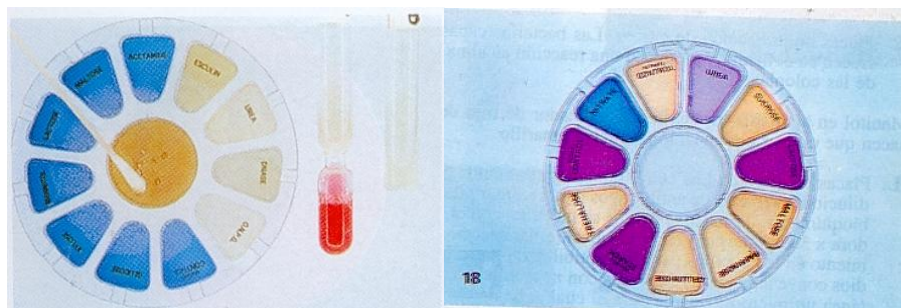


Fig.3.21 Sistema UNI/NF TEK³

3. SISTEMA RAPID NF PLUS

El sistema consta de 10 cavidades de reacción excavadas en la periferia de una placa de plástico descartable. Las cavidades de reacción contienen reactivos deshidratados y la placa permite la siembra simultánea de cada cavidad con una cantidad predeterminada de inóculo. Cuando el inóculo de prueba se agrega a la cavidad de reacción, el sustrato se rehidrata y se inicia la reacción. Después de una incubación de 4 horas se observa la cavidad en busca de reacción de color. En algunos casos los reactivos deben de agregarse a las cavidades de prueba para asegurarse que ocurra un cambio de color.

El patrón resultante de reacciones de pruebas negativas y positivas se utiliza como base para identificación del aislamiento en estudio, por comparación con los resultados de las pruebas obtenida con microorganismos conocidos, almacenados en una base de datos generada por computadora.

Sustratos adquiridos: arginina dihidrolasa, utilización de tioles alifáticos, hidrólisis de triglicéridos, la hidrólisis enzimática de los sustratos glucosídicos o nitrofenilo unidos por fosfoésteres libera amarillo o-nitrofenol o p- nitrofenol: p-nitrofenil-fosfoéster; p-nitrofenil-N-acetil- β ,D-glucosaminida; p-nitrofenil- α D-glucósido; o-nitrofenil- β ,D-, galactósido; p-nitrofenil- β , D- glucósido, hidrólisis de la urea, utilización de la glucosa, utilización del triptófano con formación de indol, reducción de nitrato sódico, la hidrólisis enzimática de los sustratos unidos por β -naftilamida libera β -naftilamina libre que se detecta con el reactivo Rapid NF plus, prolina β -naftilamida, pirrolidina β -naftilamida, γ -glutamil β -naftilamida, triptófano β -naftilamida, N-bencil-arginina- β -naftilamida. Las pruebas anteriores, junto con la de oxidasa, proporcionan 18 parámetros de prueba.^{3,9}



Fig.3.22 Sistema RAPID NF PLUS³

E. Sistemas de identificación para bacterias

1. MICROPLACAS BIOLOG GN (Biolog Inc.)

El Biolog Microplate Identification System identifica bacilos gramnegativos no fermentadores, enterobacterias y cocos gram positivos. La versión 3.50 de la base de datos contiene 275 especies y biogrupos de bacilos gramnegativos no fermentadores. Identifica microorganismos sobre la base de la oxidación de una

variedad de sustratos. El sistema consiste en una placa de microtitulación de 96 pocillos que prueba la capacidad de los microorganismos para utilizar (oxidar) una o más de las 95 diferentes fuentes de carbono en presencia de un indicador redox (colorante tetrazolio). Un pocillo no contiene hidratos de carbono y sirve como control negativo o pocillo de referencia. La placa se siembra con una suspensión del microorganismo y se incuba durante 4 o 24 horas. Todos los nutrientes necesarios y bioquímicos están preubicados y secos en los 96 pocillos de la placa. Se utiliza el violeta de tetrazolio para detectar colorimétricamente la respiración aumentada que ocurre en las células cuando se oxida la fuente de carbono.

Sin considerar su estructura, virtualmente cualquier sustrato bioquímico que es oxidado por la célula resultará en la formación de NADH, conduciendo a un flujo de electrones a lo largo de una vía de transporte de electrones. Los colorantes redox, como el tetrazolio, capturan los electrones de ese flujo y convierten la sal de tetrazolio a formazán, sumamente coloreado.

Por lo tanto, si una célula se expone a un químico que puede oxidar, su respiración aumenta y la sustancia sin color se reduce irreversiblemente a formazán, tornándose de color púrpura. Si a la célula se le da un químico que no puede oxidarse, no se produce la reacción y no se forma color. La prueba rinde un patrón de pocillos púrpura que constituye la “huella digital metabólica” de las capacidades de un microorganismo inoculado. Se informó que se obtenían resultados significativamente mejores cuando las placas fueron leídas manualmente, más que cuando fueron leídas por un lector automático.^{3,4}



Fig.3.23 Sistema Biolog GN Microplate³

2. SISTEMA ID BBL CRYSTAL ENTÉRICO NO FERMENTADOR

El sistema de identificación BBL Crystal (ID) de bacterias entéricas/no fermentadoras (E/NF) sirve para la identificación de bacterias aerobias gram-negativas que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae así como también de los bacilos gram negativos fermentadores y no fermentadores de glucosa aislados con más frecuencia. La base de datos de los no fermentadores incluye 24 taxa que representan 10 géneros diferentes. En este grupo se encuentran algunas

especies de importancia médica de *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Moraxella*, *Ochrobactrum*, *Oligella* y *Pseudomonas*.

FUNDAMENTO

Los análisis utilizados en el sistema BBL Crystal E/NF ID están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores. Las reacciones de fermentación detectan la capacidad de un aislado para metabolizar los carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico, y las reacciones de oxidación están basadas en la capacidad de un organismo para metabolizar el sustrato siendo el oxígeno el aceptor final de electrones. Ambas reacciones se detectan normalmente mediante el uso de un indicador de pH en el sustrato del análisis. Contienen sustratos unidos a un cromógeno para detectar las enzimas que utilizan los microbios para metabolizar distintos sustratos.

Los sustratos cromógenos al sufrir hidrólisis producen cambios de color que pueden ser detectados visualmente. Además, existen otros análisis que detectan la capacidad de un organismo para hidrolizar, degradar, reducir o utilizar de otro modo un sustrato en el sistema BBL Crystal ID.

DESCRIPCIÓN

Sistemas BBL Crystal no fermentadores/entéricos contiene un taparrecipiente con 30 sustratos deshidratados en los extremos de dientes plásticos. Se prepara una suspensión para el ensayo y se agrega a los 30 pocillos en la base de la unidad. La tapa se alinea entonces con la base y se cierra como corresponde, mientras que el inóculo rehidrata las sustancias secas e inicia las reacciones de la prueba. Luego de la incubación, los paneles se leen desde abajo utilizando el transiluminador BBL Crystal. Los pocillos se examinan para el cambio de color, y se genera un perfil numérico de 10 dígitos que es introducido en una computadora personal que tiene instalado el codificador BBL Crystal, a fin de obtener la identificación. ^(3, 4, 10)

Sustratos: Arabinosa, Manosa, Sacarosa, Melibiosa, Ramnosa, Sorbitol, Manitol, Adonitol, Galactosa, Inositol, p-n-p-fosfato, p-n-p a- β -glucósido, p-n-p- β -galactósido, Prolina nitroanilida, p-n-p bis-fosfato, p-n-p-xilósido, p-n-p-a-arabinósido, p-n-p-fosforilcolina, p-n-p- β -glucurónido, p-n-p-N-acetil glucosamidina, γ -L-glutamil p-nitroanilida, Esculina, p-nitro-DL-fenilalanina, Urea, Glicina, Citrato, Ácido malónico, Cloruro de trifenil tetrazolio, Arginina, Lisina. ¹⁰



Fig.3.24 Sistema BBL Crystal entérico no fermentador ³

3. MINITEK

El sistema Minitex está diseñado para la identificación de micrococcos, estafilococos, estreptococos y enterobacterias.

Puede ser sumamente recomendado para microbiólogos que deseen libertad de selección de las características de identificación. Los fabricantes proveen aproximadamente cuarenta discos de papel filtro impregnados con diversas sustancias de prueba e hidratos de carbono. Los discos se colocan dentro de las cubetas de una placa plástica, cada cubeta se siembra con 0.05 mL de una suspensión del microorganismo en caldo y la placa se incuba en un humidificador durante 18 a 24 horas.

La interpretación de las reacciones de color después del agregado de los reactivos a algunas de las cubetas genera un número código de siete dígitos. Para la identificación se consulta un libro de códigos.

Las diversas elecciones de sustratos proporcionan al usuario una gran flexibilidad en cuanto a la identificación de grupos de microorganismo distintos de Enterobacteriaceae; se ha logrado un éxito considerable en la identificación de bacilos no fermentadores, anaerobios y en levaduras de importancia medica.

En general las reacciones de color son visiblemente distintas, y el uso de muchas cartas de comparación de color hace que la identificación sea relativamente sencilla. El fabricante también proporciona un minicoder, un dispositivo de grilla plástica que permite una rápida identificación clasificación de candidatos bacterianos con cada perfil bioquímico seleccionado.

Una desventaja de permitir la selectividad completa del usuario de las características de identificación es la dificultad de estandarizar los números biotípicos. Por el contrario, si el usuario selecciona un juego optimizado de pruebas, teóricamente se derivará el mejor número biotípico posible. Debido a que el panel Minitex Gram-Positive también se usa para identificar micrococcos y estreptococos la selección de pruebas para la variedad de especies de estafilococos no es la óptima.

La necesidad de adquirir varias piezas de equipos y suplementos hace que la inversión sea en cierto modo costosa. Además, el sistema requiere varias manipulaciones manuales en la inoculación, incubación y pasos de interpretación. La necesidad de cubrir con aceite mineral los discos y el medio de cultivo dentro

de los pocillos de reacción agrega un paso extra en el procedimiento y muchos usuarios lo consideran complicado.^{4,5}

Sustratos: Arginina dihidrolasa, Citrato, Esculina, Sulfuro de hidrógeno, Indol, Lisina descarboxilasa, Malonato, Nitrato, ONPG, Ornitina descarboxilasa, Fenilalanina, Ureasa, Voges-Proskauer, Todos los hidratos de carbono.⁹



Fig.3.25 (Figura de la izquierda) Método de inoculación del sistema MINITEK. Se está aspirando una suspensión del microorganismo a través de una pipeta inserta en una pistola distribuidora automática. La pistola está calibrada para extraer la cantidad correcta de inóculo que se lleva a cada uno de los pocillos en la bandeja de plástico (izquierda abajo). La bandeja contiene discos impregnados con reactivos, como se muestra aquí.



Fig. 3.26 (Figura de la derecha) se muestra la ubicación de la bandeja inoculada en la cámara humidificadora antes de la incubación.



Fig. 3.27 Sistema MINITEK utiliza discos de papel filtro impregnado en el sustrato, distribuido en cada orificio de prueba antes de la inoculación con una suspensión bacteriana.³

4. SISTEMA API 20E Y RAPID NPT (API NPT)

FUNDAMENTO

Sistema utilizado para la identificación de enterobacterias y bacilos gram negativos no fermentadores.

El sistema consiste en tiras plásticas con 20 cúpulas miniaturizadas que contienen los sustratos deshidratados y una cámara plástica de incubación con una cubierta floja. Cada cúpula tiene un pequeño orificio por encima a través del cual puede inocularse la suspensión bacteriana con una pipeta. La acción bacteriana sobre los sustratos produce cambios de color que se interpretan visualmente. El sistema identifica un alto porcentaje de bacterias dentro de 24 horas, sin la necesidad de determinar características fisiológicas y tiene una base de datos enorme que incluye cepas comunes y atípicas. El índice perfil del API, el cual puede usarse manualmente o con la asistencia de una computadora, proporciona la frecuencia de probabilidad de varias cepas que deben considerarse para cada número biotípico.

El sistema es en cierta forma difícil de inocular; un problema, sin embargo, que supera rápidamente con la práctica. Después de la inoculación, las tiras deben manipularse con cuidado de modo que las suspensiones bacterianas no se derramen y contaminen el medio circundante. Se requiere de práctica para interpretar reacciones límites ocasionales, las cuales pueden afectar el número biotípico y la identificación final.

PROCEDIMIENTO

Agregue 5mL de agua corriente a la bandeja de incubación para proveer una atmosfera húmeda durante la incubación. Ubique una tira API 20E dentro de la bandeja de incubación. Prepare la suspensión bacteriana del microorganismo que se va a probar mediante suspensión de las células de una colonia bien aislada en 5mL de solución salina 0.85% estéril. La turbidez de la suspensión debe compararse con el estándar 0.5 de la escala de Mc Farland, excepto para identificaciones del mismo día de Enterobacteriaceae donde la suspensión se empareja con el estándar.

Usando una pipeta pasteur, llene cada cúpula con la suspensión bacteriana a través del orificio de inoculación. Cubra las tres cúpulas para descarboxilasa y ureasa con aceite mineral estéril. La unidad debe incubarse a 35°C durante 5 horas (identificación en el día) o por 24 a 48 horas antes de la lectura de los resultados.

Sustratos incluidos.- ONPG, Arginina, Lisina descarboxilasa, Ornitina descarboxilasa, Citrato, Sulfuro de hidrógeno, Ureasa, Triptófano desaminasa (agregue 10% de FeCl₃), Indol, Voges-Proskauer (Agregue KOH y α -naftol),

Gelatina, Glucosa, Manitol, Inositol, Sorbitol, Ramnosa, Sacarosa, Melobiosa, Amigdalina, Arabinosa.

Pruebas suplementarias para bacilos Gram negativos no fermentadores:

Oxidasa, NO_2 , N_2 gaseoso, motilidad, Mac Conkey, OF glucosa-oxidativo, OF glucosa-fermentativo. Si la glucosa es positiva, agregar reactivos, realizar una prueba de oxidasa, y calcular un número de perfil de siete dígitos; si la glucosa es negativa pero hay tres o más reacciones positivas antes de agregar los reactivos, proceder como antes; si la glucosa es negativa y se observan menos de tres reacciones positivas, no agregar reactivos reincubar la tira durante 24 horas más y sembrar un OF con glucosa, un medio para motilidad y un agar de Mac Conkey después de 48 horas agregar los reactivos, hacer una prueba de oxidasa y calcular el número de perfil de nueve dígitos.^{1, 3, 4, 11}

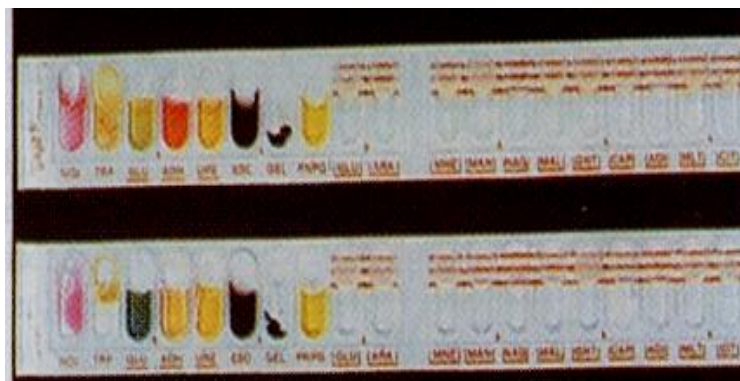


Fig. 3.28 Tiras de API NFT que muestran reacciones de 24 horas (arriba) y 48 horas (abajo). Nótese que las primeras 8 pruebas (leyendo de izquierda a derecha) son reacciones colorimétricas convencionales, mientras que las doce restantes son reacciones de asimilación de carbono, que se leen como positivas cuando aparece un crecimiento turbio, o como negativas en la ausencia de esa turbidez. Estas tiras se incuban a 30°C.³

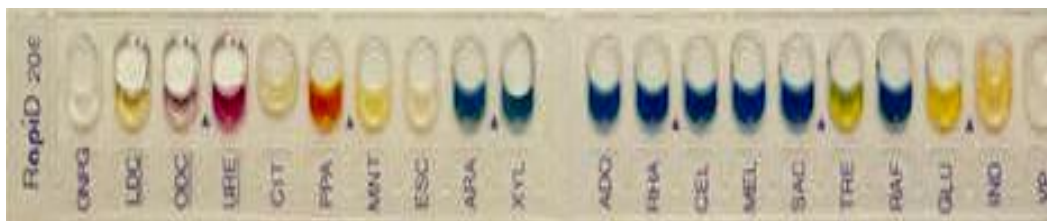


Fig.3.30 API RAPID 20E Para Enterobacterias¹⁷

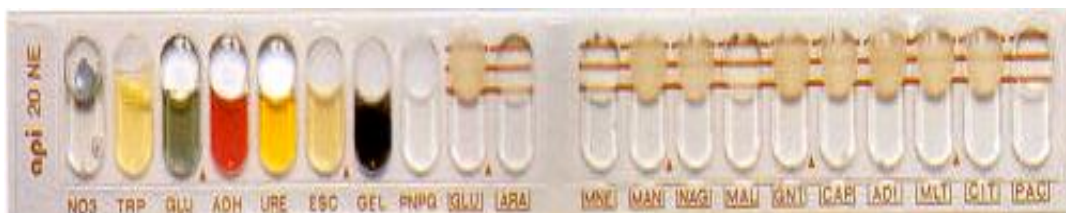


Fig.3.29 API 20 NE Para otros bacilos gram negativos diferentes a las enterobacterias.^{3, 15, 17}



Fig.3.30 Tiras API20-E mostrando el método de la inoculación y la apariencia de la tira luego de la inoculación y la incubación. Se transfiere con una pipeta una suspensión del microorganismo a ensayar a cada una de los 20 compartimientos de medio. Las reacciones de color son leídas después de 18-24 horas de incubación a 35°C. El fabricante entrega hojas de trabajo para registrar las interpretaciones visuales de las reacciones colorimétricas, que luego son convertidas en números biotípicos de siete dígitos.¹⁵

5. Sistema RapID NH

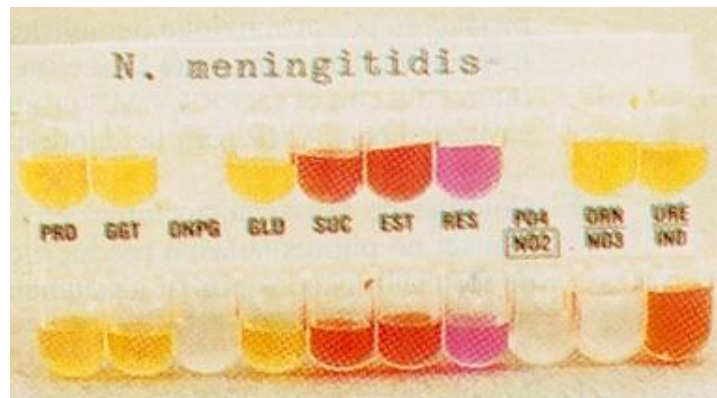


Fig.3.32 Sistema RapID NH La figura muestra dos paneles sembrados por duplicado con *N.meningitidis*. El panel superior es el sistema sin agregado de reactivos a las últimas 3 cubetas bifuncionales de prueba. Las reacciones que identifican el aislamiento como *N.meningitidis* son las positivas para PRO (prolil aminopeptidasa) y GGT (γ -glutamil aminopeptidasa), La reacción positiva para GLU (glucosa) y la prueba positiva NO₂ (reducción de nitritos).³

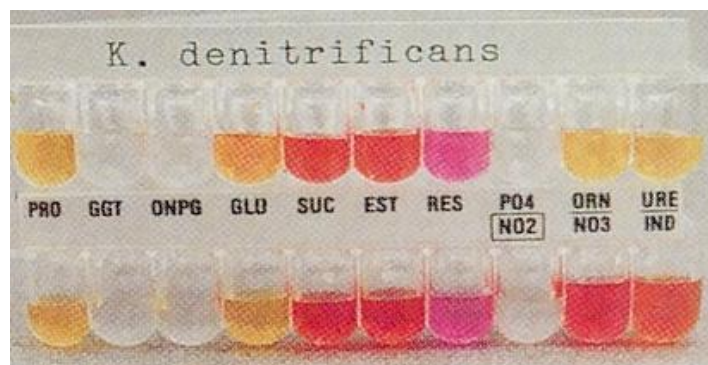


Fig.3.33 Panel RapID NH sembrado con *k. denitrificans*. En esta figura se muestran dos paneles idénticos; el panel superior, antes del agregado de los reactivos para nitrato e indol, y el inferior, una vez agregados estos reactivos. Las reacciones positivas del panel para este microorganismo oxidasa positiva, catalasa negativo son la prolilaminopeptidasa (PRO), fermentación de la glucosa (GLU), y pruebas positivas de reducción de nitratos (NO_3) y nitritos (NO_2). Los resultados de todas las otras pruebas son negativos.³

6. SISTEMA BactiCard Neisseria. (Remel Laboratories, Lenexa KA).

Esta tira para identificación contiene cuatro pruebas con sustratos enzimáticos cromógenos para la identificación de especies patógenas de *Neisseria* y de *M. catarrhalis*. Tira de la izquierda si aparece color verde-azulado en la zona de prueba IB (butirato esterasa) el microorganismo identificado es *M. catarrhalis*. Si no hay desarrollo de color en esta zona, la tira se incuba durante 13 minutos más. Si aparece color verde-azulado en la zona de prueba BGAL (β galactosidasa) (tira del extremo derecho) durante este lapso, el microorganismo se identifica como *N.lactamica*. Si no hay desarrollo de color durante el periodo de incubación, se agrega una gota del revelador de color a las áreas de prueba PRO y GLUT. La aparición de color rojo en PRO (prolilaminopeptidasa) identifica el aislamiento como *N. gonorrhoeae*, en tanto que el desarrollo de color rojo en GLUT (γ -glutamil amino peptidasa) identifica el aislamiento como *N.meningitidis*.³



Fig. 3.34 Sistema BactiCard Neisseria.³

7. SCEPTOR GRAM-POSITIVE MIC/ID PANEL

El Sceptor Panel es un sistema combinado de identificación-susceptibilidad microbiana en el cual los agentes antimicrobianos y los medios para pruebas bioquímicas se encuentran desecados en las cubetas de una placa de microtitulación. El panel se siembra con una suspensión de microorganismos por medio del sembrador automático Sceptor y se lee manualmente después de la incubación. Los resultados de la prueba se ingresan en la computadora del sistema para su identificación. La batería de pruebas del Sceptor es igualmente a la del equipo Minitek Gram-Positive. El rendimiento de este sistema en la identificación de estafilococo no ha sido evaluado.³

8. SISTEMA SCEPTOR (Becton Dickinson Instruments Systems)

El sistema Sceptor permite la hidratación e inoculación simultánea de paneles de sustrato secos en bandeja de microtitulación para la identificación de Enterobacteriaceae. Primero se hace una suspensión en caldo de los microorganismos que van a ser estudiados (5mL de caldo de triptico de soja) y luego se lo transfiere a un recipiente descartable. Este reservorio se ubica en un dispositivo de inoculación automática, y las placas son simultáneamente hidratadas e inoculadas al sustrato de los pocillos. Los pocillos con Arginina, sulfuro de hidrógeno, lisina, ornitina y ureasas se cubren con aceite mineral estéril. Los paneles se incuban a 35°C durante 18 a 24 horas. Inmediatamente después de la incubación, se agregan el reactivo de Kovacs y el cloruro férrico a los pocillos de indol y triptófano, respectivamente. Las reacciones se interpretan visualmente y se ingresan en forma manual en un módulo de computadora. Los programas de computadora proporcionan un número biotípico de 7 dígitos e identificación.³

9. SISTEMAS SENSITITRE (Accu Med International Inc)

El sistema sensititre puede adquirirse como un sistema de identificación entérica manual o en forma de un autoidentificación. La placa manual contiene medios para llevar acabo 23 pruebas bioquímicas estándar, más el control, los cuales están secos en los pocillos de una bandeja de microtitulación de tamaño estándar de 96 pocillos. Cada bandeja contiene cuatro juegos duplicados de pocillos bioquímicos que permiten la identificación simultánea de cuatro microorganismos por bandeja. El sistema contiene pruebas bioquímicas convencionales y se inocula y se lee manualmente.³

10. SISTEMA DE AUTOIDENTIFICACIÓN DE GRAMNEGATIVOS SENSITITRE

Este sistema utiliza tecnología fluorescente para detectar crecimiento bacteriano y actividad enzimática. El sistema consiste en 32 pruebas bioquímicas formuladas en forma reciente, que incluyen medios bioquímicos clásicos

seleccionados y reformulados para generar una señal fluorescente, junto con pruebas fluorescentes de reciente desarrollo.

Cada medio para las pruebas bioquímicas y el indicador fluorescente apropiado se encuentran desecados dentro de cada pocillo individual de la placa Sensititre. Cada placa está diseñada para ensayar tres microorganismos separados. Dado que estas son placas secas, pueden almacenarse a temperatura ambiente. La presencia o la ausencia de fluorescencia de todas las pruebas de autoidentificación se leen en el autolector Sensititre. Los resultados son transmitidos a una computadora para el análisis e identificación, y pueden ser leídos después de 5 horas de incubación.

Si en 5 horas no se puede obtener un nivel satisfactorio de identificación, la placa debe ser reincubada y leída tras una incubación de toda la noche. Debido al uso de tecnología fluorescente, estas placas no pueden ser leídas en forma manual y solo es posible hacerlo en un autolector Sensititre estandarizado de modo correcto.

Para pasar los estándares de la Food and Drug Administration (FDA), todos estos sistemas deben llevarse a cabo con una certeza igual o mejor que la de los métodos de referencia. Por lo tanto, cada sistema puede ser usado en laboratorios clínicos, pero la elección depende de distintas variables, entre ellas el volumen de las pruebas, la experiencia del personal técnico, la necesidad de identificación definitiva y el costo de operación.^{3,4}

F. Sistemas automatizados de prueba de sensibilidad a antimicrobianos.

El Vitek de última generación, el 2, realiza todos los pasos requeridos para las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos (AST) después que se preparó y estandarizó la suspensión primaria.

Basado en la tecnología del Vitek, el inóculo del Vitek 2 AST se introduce en forma automática, a través de un tubo de llenado, en una tarjeta miniaturizada de plástico de 64 cubetas, cerrada, que contiene determinadas concentraciones de antibióticos (fig. 3.5).

Las tarjetas se incuban en un compartimiento con temperatura controlada. Se hacen lecturas ópticas cada 15 minutos para medir la cantidad de luz transmitida a través de cada cubeta, incluida una cubeta de control de desarrollo. El análisis algorítmico de la cinética de desarrollo en cada cubeta se realiza por el programa del sistema para calcular los datos de CIM. Los resultados de CIM se convalidan con el programa Advanced Expert System (AES), se les asigna una categoría de interpretación y se informan los patrones de resistencia a antimicrobianos del microorganismo. La detección de la resistencia se mejora con el sofisticado programa AES, que puede reconocer e informar patrones de resistencia utilizando las CIM. En resumen, este sistema facilita las pruebas de sensibilidad estandarizadas en un ambiente cerrado con resultados convalidados y reconocimiento del mecanismo de resistencia a antimicrobianos de un microorganismo en 6 a 8 horas para la mayoría de las bacterias importantes para la clínica (fig.3.4).^{1, 3, 4, 6}



Fig. 3.35. Los componentes del Vitek 2 System son la caja del instrumento, el dispositivo de proceso de la muestra y lectora/incubadora, el puesto de trabajo de la computadora, que proporciona el análisis y el almacenamiento de datos e informes epidemiológicos, la Smart Carrier Station que es la interfaz directa entre el microbiólogo y el instrumento, y un escáner de código de barras para facilitar el ingreso de los datos.^{1,6}



Fig. 3.36. La tarjeta para prueba de sensibilidad a antimicrobianos Vitek 2 contiene 64 cubetas con concentraciones múltiples de hasta 22 antibióticos. El antibiótico se rehidrata cuando se introduce la suspensión de microorganismo en la tarjeta durante el proceso de llenado automatizado.^{1,6}

1. SISTEMA VITEK

La nueva versión de tarjeta, llamada GNI+Card tiene 20 nuevas especies adicionales agregadas a la base de datos y ofrece desempeños mejorados y velocidad de identificación incrementada. Moos y col. informaron que GNI+ identifica microorganismos fermentadores de la glucosa en 2 a 8 horas y microorganismos no fermentadores en 4 a 12 horas, con 40.1% de los microorganismos probados identificados en 3 horas.

El sistema Vitek ha encontrado amplio uso en los laboratorios de microbiología clínica y ha sido aceptado como una aproximación confiable para la identificación rápida de bacilos gramnegativos.

Acorta el tiempo de trabajo para obtener resultados, en muchos casos se puede obtener en el mismo día y en que el flujo de trabajo puede integrarse como para manipular microorganismos pertenecientes a muchos grupos diferentes con gasto mínimo de tiempo para los técnicos, sencillamente utilizando las tarjetas adecuadas.

Sin embargo, la experiencia ha demostrado que debe considerarse el uso de un sistema de apoyo apropiado para identificar aquellos microorganismos para los cuales el Vitek no proporciona un nivel de identificación aceptable.^{3, 4, 6}

2. TARJETA VITEK GRAM-POSITIVE IDENTIFICATION (GPI)

Esta tarjeta (Vitek Systems, Inc.) es la misma que se usa para la identificación de estafilococos coagulasa negativos y ciertos bacilos grampositivos facultativos no esporulados. Contiene 27 pruebas y dos controles, y proporciona identificaciones automatizadas en un lapso de 4 a 13 horas. En las evaluaciones iniciales la tarjeta GPI proporcionó excelentes resultados para los microorganismos del grupo D, pero funcionó con menos eficacia para identificar los *Streptococcus viridans*. Esta tarjeta ha sido ligeramente modificada desde su aparición inicial y la base de datos fue actualizada. La tarjeta modificada con la base de datos ampliada no ha sido evaluada aún. La base de datos para la identificación de estreptococos incluye los estreptococos beta hemolíticos, estreptococos grupo D, especies de *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*), algunas especies de *Streptococcus viridans*, *S. anginosus* y especies de *Aerococcus*. Las especies de *Enterococcus* de aislamiento menos frecuente, pero de importancia clínica, como *E. casseliflavus*, no están incluidas en la base de datos y, pueden identificarse por error como *E. faecium*. Como sucede con otros sistemas, las especies de *Streptococcus viridans* de descripción más reciente no están incluidas aún en la base de datos.^{3, 4, 6}

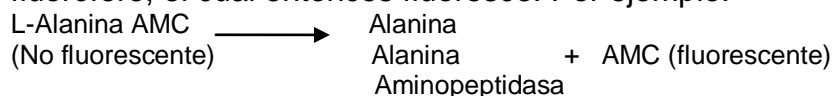
3. VITEK GRAM POSITIVE IDENTIFICATION CARD (GPI)

La tarjeta Vitek GPI es una tarjeta para la identificación de microorganismos gram positivos diseñada para ser usada con el sistema automatizado de identificación-susceptibilidad bacteriana Vitek. La tarjeta contiene micro cubetas (28 cubetas de prueba y 2 cubetas control) con sustratos para la identificación de especies de staphylococcus (11 especies humanas y 4 especies veterinarias), especies de Streptococcus y varias especies de bacilos gram positivos (por ejemplo; especies de *Corynebacterium*, *Erycipelothrix rhusiopathiae* y *listeria monocytogenes*). Se prepara una suspensión del microorganismo en solución fisiológica y la tarjeta se adosa a la suspensión bacteriana por medio del tubo de trasferencia y se coloca en el módulo de llenado del instrumento. La tarjeta se siembra por un método de liberación por vacío y a continuación se coloca en módulo de lectura-incubación del instrumento Vitek, donde es barrida ópticamente y leída en forma periódica. La identificación de estafilococos coagulasa-negativos generalmente requiere entre 10 y 13 horas.^{3, 4, 6}

4. SISTEMA MICROSCAN WALKAWAY (Dade Microscan)

Es un instrumento completamente automatizado que incuba cualquier combinación de hasta 96 paneles convencionales o Rapid MicroScan simultáneamente, agrega en forma automática los reactivos a los paneles convencionales cuando se requiere, lee e interpreta los resultados de los paneles e imprime los resultados, todo sin intervención del operador.

En función de la placa de microdilución usada, el desarrollo bacteriano puede detectarse por espectrofotometría o fluorometría. Se dispone de paneles fluorescentes Rapid además de los paneles convencionales MicroScan para utilizarlos con el instrumento Walkaway. Los paneles analizados por espectrofotometría requieren incubación durante una noche y los patrones de desarrollo pueden leerse en forma manual. Los paneles rápidos usan compuestos marcados con fluoresceína y requieren solo dos horas de incubación para la identificación bacteriana. El análisis fluorométrico se basa en la degradación de sustratos fluorógenos por las bacterias viables para detectar la inhibición bacteriana por los agentes antimicrobianos. Cada sustrato fluorescente consiste de un fluoróforo, o metilumbeliferona (MEU) o 7-amino-4-metil-cumarina (AMC) unida a fosfato, azúcar o aminoácido. Ocurren tipos de reacciones: fluorogénica y fluorométrica. En las reacciones fluorogénicas una enzima específica, si está presente en la suspensión bacteriana, el compuesto fluorescente liberando el fluoróforo, el cual entonces fluoresce. Por ejemplo:



Las reacciones fluorométricas detectan cambios de pH tal como ocurre en la fermentación de hidratos de carbono. La producción de ácido resultante causa una caída del pH y un decrecimiento de la fluorescencia. Además, se usan ocho reacciones fluorogénicas. Estas miden la tasa de liberación del fluoróforo y se usan para diferenciar especies fenotípicamente similares. El método fluorogénico puede proporcionar los resultados de sensibilidad en 3,5 a 5,5 horas. Los resultados de las reacciones ID son convertidos en biocódigos de 15 dígitos para la interpretación por computadora. El sistema óptico colorimétrico Walkaway tiene 97 fotómetros iluminados por una única fuente de tungsteno halógena a través de 97 fibras ópticas. La luz de la fuente pasa a través de los filtros de interferencia sobre una rueda de color y se enfoca sobre las fibras ópticas, 96 de las cuales reflejan la configuración de un panel con 96 pocillos. El fotómetro 97 provee la línea base de la lectura a partir de la cual las señales del fotómetro son normalizadas. Durante cada ciclo de lectura, la rueda de color giratoria provee de lecturas a seis longitudes de onda a través del espectro visible. Para las reacciones bioquímicas, la computadora selecciona la longitud de onda de lectura que mejor discrimina la reacción que ocurre en cada pocillo. El panel actualizado (Rapid Gram Negative Identification Panel 3) consiste de 36 pruebas recientemente formuladas y una nueva base de datos que incluye 138 taxones, entre las cuales hay 19 nuevas especies adicionales.

Los paneles rápidos MicroScan proporcionan una identificación en dos horas lo que permite disponer de suficiente tiempo para poner en marcha pruebas suplementarias si fuera necesario para la identificación en el mismo día o en el día siguiente.^{1, 3,4}



Fig. 3.37 Para incubación, lectura e interpretación automatizadas de pruebas de sensibilidad a antimicrobianos. Este mismo instrumento se usa para la identificación de bacterias.^{1, 3,4}

5. MICROSCAN RAPID

El lector de paneles microbiológicos AutoScan-4 está ideada para utilizarse como instrumento de diagnóstico en la identificación y determinación de patrones de sensibilidad antimicrobiana *in Vitro* de microorganismos aislados a partir de muestras clínicas humanas. Se utilizan en conjunto con los paneles de microdilución MicroScan que contienen agentes antimicrobianos en diluciones en serie y productos bioquímicos seleccionados.

Las determinaciones de la CIM y la identificación están basadas en la medida de la turbidez o de los cambios de color que ocurren en los pocillos de un panel MicroScan.

El lector automático de paneles microbiológicos AutoScan-4 utiliza un sistema óptico para detectar crecimientos bacterianos en los pocillos de los paneles MicroScan. La intensidad de la luz detectada debajo de cada pocillo es inversamente proporcional a la concentración de bacterias en ese pocillo.

Además, algunos pocillos contienen sustratos bioquímicos que experimentan un cambio de color en presencia de determinadas bacterias. Una medición espectrofotométrica condensada proporciona información acerca del color de la solución que contiene el pocillo. La información óptica se convierte en señales eléctricas (voltaje) y se procesa en la unidad de control.

Para la identificación, las señales eléctricas correspondientes a la intensidad de la luz que pasa a través de cada pocillo con productos bioquímicos se convierte en una serie de valores digitales (es decir signos + o -) que indica que ha ocurrido (+) o no (-) un cambio de color. Estos valores se almacenan en la memoria del computador.

Basándose en los resultados (+ o -) de cada pocillo con los productos bioquímicos, el computador calcula un número de biotipo que identifica el microorganismo desconocido.

El sistema óptico consta de una fuente luminosa halógena de tungsteno, filtros de interferencia, cables de fibra óptica, dispositivos colimadores y transductores con fotodiodos.^{2,4}

a. Paneles gram negativos y gram positivos CIM/Combo

La identificación de los microorganismos se lleva a cabo midiendo una serie de productos bioquímicos contenidos en paneles diseñados para la distinción de especies Gram positivas y Gram negativas.

Los paneles contienen productos bioquímicos contenidos en paneles diseñados para la distinción de especies gram positivas y gram negativas. Los paneles contienen productos bioquímicos que experimentan reacciones en presencia de microorganismos, detectables por un cambio de color causado por la variación del pH, la adición de reactivos o la presencia o ausencia de reactivos en algunos pocillos.

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana son una miniaturización de la prueba de sensibilidad a dilución de caldo, la cual ha sido deshidratada. Varios agentes antimicrobianos son diluidos en caldo Mueller Hillton, con suplementos de calcio y magnesio a concentraciones que bordan el límite de interés clínico. Los paneles Combo de puntos de corte usan concentraciones equivalentes a los puntos de corte categóricos de CLSI. Trimetoprim, sulfametoxazol, y el caldo trimetoprim/sulfametoxazol contienen timidina fosforilasa par reducir niveles de timidita en el medio. Después de la inoculación y rehidratación con suspensión estandarizada de microorganismos e incubación a 35°C por un mínimo de 16 horas, la concentración inhibitoria mínima (CIM), a una sensibilidad cualitativa (sensible, intermedio, o resistente) para el organismo en prueba, se determina observando la mayor concentración antimicrobiana que muestra inhibición de crecimiento. Pruebas convencionales y cromogénicas modificadas se usan para la identificación de bacilos gram negativos fermentadores y no- fermentadores (Para identificar Micrococaceas, Estreptococaceas, y Listeria monocytogenes). La identificación se basa en la detección de cambios de pH, utilización de sustratos, y crecimiento en la presencia de agentes antimicrobianos después de 16-42 horas de incubación a 35°C.²

b. Paneles gram negativos CIM/Combo

Los paneles están diseñados para determinar la sensibilidad a agentes antimicrobianos y/o la identificación a nivel de especie de bacilos gram negativos aerobio y anaerobios facultativos.

Paneles con cefpodoxima, ceftazimida, aztreonam, cefotaxima o ceftriaxona a 1µg/ml pueden usarse como marcadores para detectar cepas de

Escherichia coli, *Klebsiella oxytoca* o *K. pneumoniae*, posiblemente productora de betalactamasas de espectro ampliado (ESBLs).^{2, 4,12}

Sustratos de identificación Paneles gram negativos CIM/Combo			
Glucosa	Melodiosa	Esculina	OF glucosa
Sucrosa	Urea	Voges-proskaguer	OF base de descarboxilasa
Sorbitol	Sulfuro de hidrogeno	Citrato	Base de descarboxilasa
Ramnosa	Indol	Malonato	Nitrato
Rafinosa	Lisina	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido	Penicilina G 4µg/ml *
Arabinosa	Arginina	Tartrato	Kanamicina 4µg/ml *
Inositol	Ornitina	Acetamida	Colistina 4µg/ml *
Adonitol	Triftofano desaminasa	Cetrimida	Nitrofurantoina 64µg/ml *
Cefalotina 8µg/ml		Tobramicina 4µg/ml	

* Antimicrobianos usados para identificación.



Fig. 3.38 Panel MicroScan Gramnegativo³

C. Paneles gram positivos CIM/Combo

Los paneles positivos de MicroScan están diseñados para determinar la sensibilidad de agentes antimicrobianos y/o la identificación a nivel de especies de aerobios facultativos de crecimiento rápido y de cocos gram positivos, algunos cochos aerobios exigentes gram positivos *Listeria monocytogenes*.

La oxacilina líquida se suplementa con cloruro sódico. Los sinergismos utilizan caldo dextrosa-fosfato.

La producción de β-lactamasas se detecta con el método yodométrico.

La detección correcta de resistencia requiere de incubación extendida para los organismos antimicrobianos siguientes:

24 horas Enterococos Vancomicina
 Estafilococos Oxacilina

24-48 horas Enterococos Sinergismos de Estreptomina^{2, 4,13}

Sustratos de identificación Paneles gram positivos CIM/Combo			
Cristal violeta	Fosfatasa	Trehalosa	Bacitracina
Separador de Micrococos	Esculina bilis 40%	Manosa	Piruvato
Nitrato	L-pirrolinodil- β naftilamida	Cloruro de Sodio 6.5%	B-lactamasa*
Novobiocina	Arginina	Sorbitol	Pocillo para crecimiento libre de timidita
PNP- -D-glucorónido	PNP- β -D-galactopiranosido	Arabinosa	Inulina
Indoxil fosfatasa	Urea	Ribosa	Rafinosa
Voges-proskaguer	Manitol	Optoquina	Lactosa

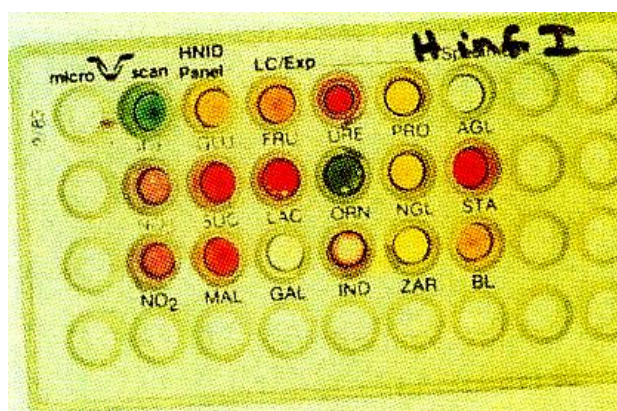
Fig.3.39 AutoScan MICROSCAN RAPID. ¹²

Fig.3.40 Panel Microscan HNID. El MicroScan *Haemophilus-Neisseria* IDENTIFICATION (HNID). Este sistema manual con placas de microtitulación identifica especies de *Haemophilus* y de *Neisseria* además de posibilitar designaciones de biotipo para *H. influenzae* y *H. parainfluenzae*. Esta figura muestra un panel sembrado con *H. influenzae* biotipo I (positivo para ureasa, ornitina descarboxilasa e indol).³

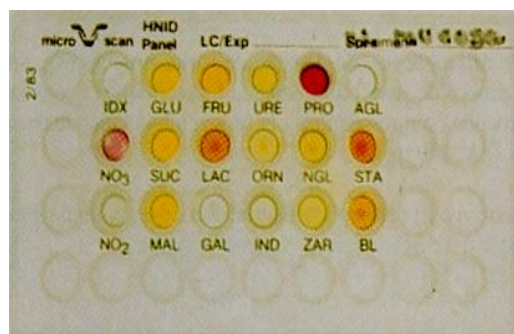


Fig.3.41 Panel MicroScan HNID. Es un panel de prueba de 4 horas para identificación de especies de *Neisseria* y *Haemophilus*. Los resultados positivos mostrados en el panel de de la figura incluyen reducción de nitratos (NO_3) y nitritos (NO_2), Producción de ácido a partir de la glucosa (GLU), sacarosa (SUC), maltosa (MAL) y fructosa (FRU) y no formación de ácido a partir de la lactosa (LAC). Estas características identifican el aislamiento, como de *N. mucosa*.³

G. Sistemas de pruebas de sensibilidad comerciales

La variedad y el uso amplio de métodos comerciales de pruebas de sensibilidad reflejan el papel importante que tiene la detección de resistencia entre las responsabilidades inherentes a los laboratorios de microbiología clínica. En muchos casos los métodos comerciales son variaciones de los métodos de dilución o de difusión con discos convencionales, y su exactitud se evaluó por comparación de sus resultados con los obtenidos por los métodos convencionales. Además, en los sistemas comerciales se respetan muchos de los medios de cultivo y condiciones atmosféricas estandarizados para los métodos convencionales. El objetivo de detectar resistencia es el mismo para todos los métodos comerciales, pero los principios y las prácticas que se aplican para lograrlo varían con respecto a: El formato en el que se reúnen las bacterias y los agentes antimicrobianos, el grado de automatización para la siembra, incubación, interpretación e informe de los resultados, el método usado para detectar la inhibición del desarrollo bacteriano, la rapidez con la que se obtienen los resultados y la exactitud es un aspecto muy importante de cualquier sistema de pruebas de sensibilidad.¹

1. MÉTODOS DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.

Se desarrollaron varios sistemas que proveen paneles de microdilución ya preparados y estructurados según las directivas para los métodos de microdilución en caldo convencionales. Estos sistemas permiten que los laboratorios realicen la microdilución en caldo sin tener que preparar sus propios paneles.

Los sistemas pueden diferir en alguna medida con respecto al volumen de las cubetas de prueba, cómo se preparan y se agregan los inóculos, la disponibilidad de diferentes suplementos para probar bacterias exigentes, los tipos de agentes antimicrobianos y los esquemas de dilución usados, y el formato del medio y de los agentes antimicrobianos (p. ej., liofilizados o congelados).

Además, el grado de automatización para la siembra de los paneles y de los dispositivos disponibles para leer los resultados varía entre los diferentes productos. En general, estos paneles comerciales están diseñados para recibir el inóculo estándar y se incuban usando las condiciones y los períodos recomendados para la microdilución en caldo convencional. Son sistemas basados en el desarrollo, que requieren incubación durante toda la noche y que aplican los criterios de interpretación del CLSI para la mayoría de los resultados.^{1,14}

2. DERIVADOS DE LA DILUCIÓN EN AGAR.

El sistema comercial Spiral Biotech Inc., Bethesda, Md. usa un instrumento para aplicar el agente antimicrobiano a la superficie de una placa de agar ya preparada en forma de una espiral concéntrica. Si se comienza en el centro de la placa, el instrumento deposita la concentración más alta de antibiótico y lo distribuye en forma centrífuga. La difusión del fármaco en el agar establece un gradiente de concentración elevado (el centro de placa) a bajo (la periferia de la placa). Si se empieza desde la periferia de la placa, la siembra bacteriana se hace en forma de una estría única, perpendicular al gradiente formado, como los rayos de una rueda. Después de la incubación se mide la distancia desde el punto en que se observa desarrollo, cerca del borde de la placa, hasta el punto en que se inhibe el centro de la placa. Este valor se usa para calcular la CIM del agente antimicrobiano contra cada uno de los aislamientos bacterianos por estría en la placa.¹

3. DERIVADOS DE LA DIFUSIÓN EN AGAR.

Existe una prueba de difusión en gradiente denominada Epsilon test (Etest, AB Biodisk) que combina la simplicidad y flexibilidad de las pruebas de disco-difusión con la capacidad para cuantificar la concentración inhibitoria mínima de las técnicas de dilución.

El Etest consiste en una tira de plástico no poroso de 5 cm de largo por 5 mm de ancho a lo largo de la cual se dispone un gradiente predefinido y señalado en la tira de un antimicrobiano equivalente a 15 concentraciones dobles progresivas. Una vez que se ha sembrado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest sobre la superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte de plástico hasta el agar, creándose de este modo alrededor y a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar a ambos lados de la tira una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. La carga indicada del punto de la tira en que el extremo de la zona de inhibición intersecciona con ella es el valor de la CIM (Figura 3.8).

El Etest es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución. Se considera adecuado para el estudio de

muy diversas bacterias, entre las que destacan, además de las bacterias no exigentes (enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores, estafilococos, enterococos), bacterias exigentes (neisserias, hemófilos, estreptococos, entre otras), bacterias anaerobias nocardias y micobacterias. Este método permite obtener datos de CIM en situaciones en las que el nivel de resistencia puede ser importante para la clínica (p. ej., penicilina o cefalosporinas contra *S.pneumoniae*).^{1,14}



Figura 3.42. Antibiotograma. Epsilon test.

El E test es una prueba con características intermedias entre las técnicas de difusión y dilución. A lo largo de la tira hay un gradiente de concentraciones del antibiótico. El microorganismo se siembra como para una prueba de difusión y se deposita la tira sobre el agar. Tras la incubación se produce un halo de inhibición. La concentración inhibitorio mínima viene dada por la concentración de antibiótico en el punto de la tira donde intercepta el halo de inhibición. Para el microorganismo representado la CIM es de 2 µg/ml.²

Otro método (BIOMIC, Giles Scientific, Inc., Nueva York) combina el uso de la metodología de difusión con discos convencional con el análisis videodigital para automatizar la interpretación del diámetro de los halos de inhibición. Las lecturas y las interpretaciones automatizadas de los halos se combinan con un programa de computadora para producir valores de CIM y para permitir manipulaciones y evaluaciones de los datos para detectar perfiles de resistencia poco frecuentes y elaborar informes de antibiogramas.^{1,14}

RESUMEN

Los sistemas automatizados y semiautomatizados para la identificación y determinación de la sensibilidad de los microorganismos hacia los antibióticos. Utilizan sustratos, enzimas y reactivos que se pueden presentar en formas de placas de microtitulación, tarjetas con orificios diminutos, cúpulas o microtubos en tiras de plástico y cámaras con sustrato en tiras plásticas.

Los sistemas varían en el método de inoculación, tiempo de incubación, tipos de pruebas incluidas en la batería, sin embargo los sistemas tienen diferente estructura, pero su fundamento es el mismo, (la fluorometría, turbidimetría y colorimetría). Los sistemas automatizados y semiautomatizados no sustituyen en su totalidad a las pruebas convencionales, porque aun se necesita de las bases para el aislamiento del microorganismo (toma de muestra, tinción de Gram, sembrado, lectura de la morfología colonial y la identificación del cultivo puro), para evitar un diagnóstico erróneo.

Posteriormente después de la obtención del cultivo puro se elige la batería a utilizar para la identificación definitiva mediante el análisis de los perfiles metabólicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Forbes A Betty, Sahm Daniel F, Weissfeld Alice S. Diagnóstico Microbiológico. 11ª ed. Madrid España: Médica Panamericana; 2004.
2. Prats Guillem. Microbiología Clínica. España: Editorial Médica Panamericana, S.A; 2006.
3. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. España: Editorial Panamericana.1999
4. Truant L Allan. Manual of Comercial Methods in Clinical Microbiology. United Status of America: Washington, D.C; 2002
5. Biomerieux [sede Web]. U.S.A: BIOMÉRIEUX, INC; 2003 [fecha de actualización: 2003 [acceso: 20 de Mayo de 2007] Identification system for staphylococci and micrococci [8 páginas]. Disponible en: <http://industry.biomerieux-usa.com/industry/index.htm>
6. Biomerieux [sede Web]. U.S.A: BIOMÉRIEUX, INC; 2007 [fecha de actualización: 2007 [acceso: 28 de Enero de 2007] Identification system API, VITEK y VITEK 2 [10 páginas]. Disponible en: <http://industry.biomerieux-usa.com/industry/pharmaceutical/identification.htm>
7. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. México D.F : Editorial Panamericana.1989
8. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2007 [acceso: 28 de Enero de 2008]. Enterotube II Prepared multimedia tube [pag. 1]. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/productCenter/211832.asp>
9. REMEL [sede Web]. U.S.A: REMEL; 2008 [fecha de actualización: 2008 [acceso: 28 de Enero de 2008] Diagnostic Tests. System Rapid NF and MicroID. Disponible en: <http://www.remelinc.com/Clinical/DiagnosticTests.aspx> y <http://www.remelinc.com>
10. Becton, Dickinson [sede Web]. USA: BD Becton, Dickinson and Company; 2005 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. Package Insert BBL Crystal Identification Systems Enteric/Nonfermenter ID Kit REF245000 [pag.11-13]. Disponible en: <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/pkgInserts.asp#PF7>
11. Biomerieux [sede Web]. U.S.A: BIOMÉRIEUX, INC; 2003 [fecha de actualización: 2003 [acceso: 20 de Mayo de 2007] API20 E Identification system for *Enterobacteriaceae* and other Gram-negative rods. [17 páginas]. Disponible en: <http://industry.biomerieux-usa.com/industry/index.htm>
12. Dade Behring [sede Web]. USA: Dade Behring,; 1999 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. MicroScan Dried Gram Negative Procedure Manual package insert [pag.1-12]. Disponible en: www.dadebehring.com
13. Dade Behring [sede Web]. USA: Dade Behring,; 1999 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. MicroScan Dried Gram Positive Procedure Manual package insert [pag.1-12]. Disponible en: www.dadebehring.com
14. Finegold Sydney M, Baron Ellen J. Diagnóstico Microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana; 1996.
15. <https://apiweb.biomerieux.com>
16. http://virus.usal.es/Web/demo_mr/Enterotube/Enterotubell.htm
17. <http://universitas.usal.es/web/fundacion/universitas/es/sistemas/microacua/Demo1/shigella.html>

IV. SISTEMAS AUTOMATIZADOS Y COMPUTARIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD DE LEVADURAS

A. Identificación de levaduras mediante criterios bioquímicos enzimáticos.

1. CHROMagar (Company, Paris, Francia)

El medio CHROMagar Candida (CHROMagar) fue descrito por Odds y Bernaerts en 1994 para identificar las especies clínicamente importantes del género *Candida*. CHROMagar Candida permite diferenciar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kruseii* y *C. glabrata* en función de los colores que desarrollan en este medio. Cada especie reacciona con un sustrato cromogénico para dar un color característico de la colonia. Cuando se lo combina con las características morfológicas de las colonias es posible obtener una identificación presuntiva.^{1,2,3,4}

CHROMagar es un medio diferencial y selectivo para el aislamiento y presuntiva identificación de levaduras en especímenes clínicos.²

La siembra se realiza según las técnicas tradicionales y las placas se incuban a 30-37°C durante 48 h para que las levaduras desarrollen completamente el color. Al cabo de este tiempo, las colonias de *C. albicans* son lisas y de color verde esmeralda, halos verdes debido a la presencia de β -N-acetilgalactosaminidasa, a diferencia de *C. dubliniensis* que desarrolla un color verde oscuro y que, además, es incapaz de crecer a 45°C [7]. *C. tropicalis* produce colonias azul oscuro con un halo púrpura-marrón en el agar que la rodea. *C. kruseii* forma colonias rugosas con el centro rosado y el borde blanco. *C. glabrata* manifiesta un color violeta morado. Las demás especies desarrollan colores y tonalidades diversas que no permiten su identificación por este medio.^{1,2,4,5}

El CHROMagar mantiene el desarrollo de levaduras y la mayor parte de hongos mientras que inhibe la mayoría de las bacterias; paralelamente es la función del Agar Dextrosa Sabouraud.²



Fig. 4.1. Crecimiento en CHROMagar Candida. *C. albicans* (verde esmeralda), *C. tropicalis* (azul), *C. kruseii* (rosa y rugosa), *C. parapsilosis* (rosácea-lisa) y *Prototheca wickerhamii* (crema, flecha).⁵

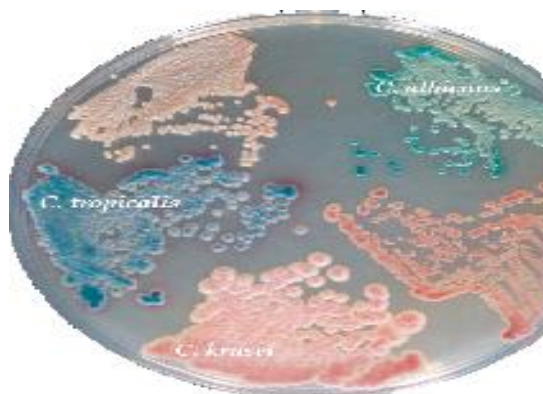


Fig. 4.2 Crecimiento en CHROMAgar Candida.
C. albicans (verde), *C. tropicalis* (azul), *C. krusei* (rosa y rugosa) ⁴

2. CROMOGEN ALBICANS

Cromogen Albicans (Biomedics) es un medio diferencial y selectivo utilizado para el aislamiento e identificación de *C. albicans* en muestras vaginales, rectales, escamas, orina, pus, escobillonados bucales, etc. La siembra se realiza según las técnicas habituales y las placas se incuban a 30-37 °C, según el origen de las muestras, durante 24-48 h.

Las colonias de *C. albicans* adquieren un color azul verdoso característico, dependiendo del periodo de incubación y la temperatura, con formas redondeadas, lisas y ligeramente elevadas. Las otras especies de levaduras aparecen de color blanco cremoso y necesitan una identificación bioquímica posterior. ⁵

3. CANDIDA ID

El medio Candida ID (bioMérieux) es un medio cromogénico que permite el aislamiento de organismos levaduriformes, la identificación presuntiva de *C. albicans* y cierta orientación para la identificación de otras especies no *albicans*. La inoculación e incubación son similares a las descritas para otros medios cromogénicos. En Candida ID, las colonias de *C. albicans* son redondeadas, ligeramente convexas, lisas, de bordes netos y de color azul (cuya intensidad varía en función del tiempo de incubación). Las colonias de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. kefyr* desarrollan un color rosa a las 48 h de incubación. Otras especies, como *C. famata*, *C. humicola*, y *Cryptococcus neoformans*, pueden originar colonias rosas más o menos intensas. El resto de las especies desarrolla un color blanco-crema, requiriendo una identificación bioquímica posterior. ⁵



Fig. 4.3. Crecimiento de *Candida albicans* (colonias azules flecha) en el medio Candida ID (bioMérieux) el resto de las especies se manifiesta de color rosa o blanco.⁵

4. ALBICANS ID2

El medio Albicans ID2 (bioMérieux) es muy parecido al anterior. Se ha enriquecido la fórmula para facilitar el aislamiento y la identificación de las colonias de *C. albicans* que desarrollan un color azul más intenso. Además, permite la identificación presuntiva de *C. tropicalis* ya que presenta una tonalidad verdosa en este medio. Las colonias de las demás especies son de color blanco. La inoculación e incubación son similares al medio anterior.⁵

5. CANDISELECT

El medio CandiSelect (Bio-Rad) es un medio selectivo que permite la identificación de *C. albicans* mediante la hidrólisis del sustrato cromogénico presente lo que origina el desarrollo de un color azul por las colonias de esta especie. La inoculación e incubación son similares a los otros medios cromogénicos. *C. albicans* se identifica por la presencia de colonias lisas azules y el resto de las levaduras manifiesta un color blanco en sus colonias. A las 48 h de incubación, algunas cepas de *C. tropicalis* y *Trichosporon* sp. Pueden también desarrollar colonias azules, pero morfológicamente son diferentes a *C. albicans*.⁵

6. AGAR SDCA-MUAG

El agar SDCA-MUAG (Biolife) es un medio muy parecido al anterior en cuya composición está presente, como sustrato, el 4-metilumberiferil-2-acetamida-2-desoxi-b-D-galactosaminida. Se interpreta de igual forma por la aparición de fluorescencia difusible de las colonias de *C. albicans*, emitida al iluminarse con luz ultravioleta a 365 nm.⁵

B. identificación mediante criterios inmunológicos.

1. BICHRO-LATEX ALBICANS (FUMOZE DIAGNOSTICS, ASNIERES, FRANCE)

Consiste en partículas de látex rojas cubiertas con anticuerpos monoclonales con especificidad de la mitad de la proteína de *C. albicans*. Las partículas de látex son suspendidas en un colorante verde, que da la mixtura total a color café. Las colonias de levaduras son emulsificadas en un agente disociante que contiene enzimas para exponer el antígeno que es reconocido por el anticuerpo monoclonal. Las pruebas son reportadas rápido y la lectura es fácil con resultados positivos apareciendo con aglutinación roja sobre un fondo verde. La prueba puede ser llevada a cabo directamente de un medio de aislamiento primario.²

a. Procedimiento

- 1) Reconstituir un vial del agente disociante, con el volumen de agua destilada indicada.
- 2) Depositar 20 µl del agente disociante sobre un círculo del portaobjetos.
- 3) A partir de un cultivo de 24-48 h en SDA, u otro medio habitual, recoger 3-4 colonias de la levadura a identificar y emulsionarlas en el agente disociante.
- 4) Homogeneizar la suspensión del látex antes de su uso.
- 5) Añadir una gota del reactivo látex en el círculo.
- 6) Mezclar y extender con el agitador suministrado por el fabricante hasta que la suspensión sea homogénea.
- 7) Agitar en un agitador durante 5 min.

b. Interpretación

- Reacción positiva: Aparición de aglutinados rojos sobre un fondo verde: *C. albicans*.
- Reacción negativa: No se observa aglutinación, mantiene su color marrón.⁵

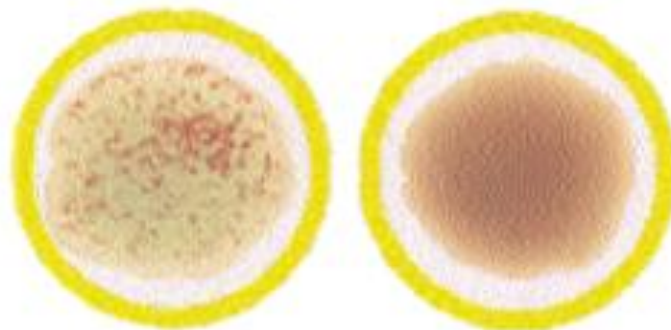


Fig. 4.4 Sistema Bichro-latex albicans (Fumouze)⁵

2. KRUSEII-COLOR (FUMOUGE)

Kruseii-color es un método para la identificación de aislamientos de *C. kruseii* por aglutinación de partículas de látex, mediante un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con el antígeno localizado en su pared. El kit contiene un reactivo Kruseii-color y 5 portaobjetos.⁵

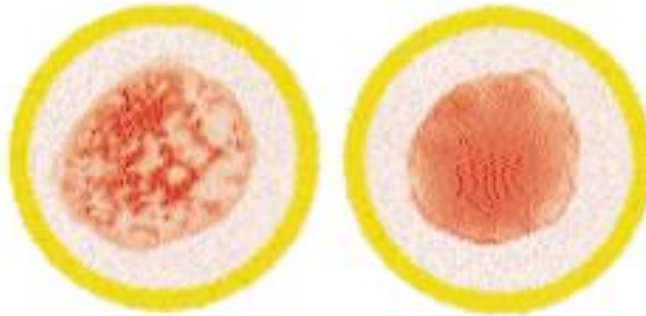


Fig. 4.5 Sistema Kruseii-color (Fumouze).⁵

a. Procedimiento

- 1) Resuspender el látex antes de su uso.
- 2) Por cada cepa a identificar dispensar una gota del reactivo de látex en el círculo del portaobjetos.
- 3) Mediante una pipeta Pasteur o un asa de platino, añadir 2 ó 3 colonias a la gota de látex y homogeneizar la emulsión.
- 4) Agitar en un agitador (5 min).

b. Interpretación

- Reacción positiva: Apariencia de aglutinación clara y evidente de color rojo indicativa de *C. kruseii*.
- Reacción negativa: Ausencia de aglutinación. La suspensión mantiene su aspecto original.
- Ciertas cepas de otras especies (Ej. *C. parapsilosis*), pueden producir agregados de color blanco que no deben ser confundidos con los agregados rojos.⁵

3. MÉTODO PARA IDENTIFICACIÓN DE *C. glabrata* RAPID TREHALOSA

Este método se basa en el principio de trehalosa por *C. glabrata* en la presencia de ciclohexamida. Base de levadura nitrógeno, trehalosa 40%, bromocresol verde (0.02%) y cicloheximida (10 000µg/ml) 3 gotas del reactivo son adicionados a cada pozo. Un inóculo denso (3 a 5 colonias de Agar Sabouraud) es emulsificado dentro de cada pozo. La placa de microtitulo es incubada por 1 hora a 37°C antes de ser leído. Un cambio de color azul a amarillo es considerado positivo.²

4. IDENTIFICACIÓN ÚNICA DE ENZIMAS: DIFERENCIACIÓN DE *C. albicans* Y *C. tropicalis*

Dos círculos sobre una tarjeta tienen impregnados con diferentes sustratos cada uno. Uno tiene 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β galactosamina (NAG) y Prolina-p-nitroanilida.

Los sustratos son deshidratados con agua destilada o desionizada y cada círculo es inoculado con dos o tres colonias de un organismo. Las tarjetas son incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente después de que se adicione una gota de reactivo de p-dimethylaminocinamaldehído.

Si NAG es adherido por la enzima específica, es liberado un componente fluorescente. Si Prolina-p-nitroanilida es pegada se forma un precipitado azul.²

C. Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans*.

En el mercado existen varios sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* a partir de una colonia aislada en cualquiera de los medios convencionales. En todos ellos se detecta una o dos enzimas (β -galactosaminidasa y L-prolina aminopeptidasa), sólo presentes en *C. albicans*. Para la detección de estas enzimas, los sistemas comerciales pueden utilizar sustratos fluorogénicos o cromogénicos.⁵

1. SISTEMAS ENZIMÁTICOS QUE UTILIZAN SUSTRATOS FLUOROGÉNICOS

Para su utilización, todos estos sistemas requieren el empleo de una lámpara de luz ultravioleta de 365 nm (Linus).

a. Prueba BactiCard para Candida.

1) Fundamento y descripción

La enzima MUGAL tiene la capacidad de hidrolizar el sustrato 4-metilumbeliferil- N-acetil- β -D-galactosaminida y producir la liberación de 4-metilumbeliferona que es una sustancia fluorescente capaz de ser detectada al iluminarse con luz ultravioleta de 365 nm. La enzima PRO hidroliza al sustrato L-prolina- β -naftilamida y reacciona con el *Color Developer* originando un color rojo.⁵

El BactCard Candida test (Remel Laboratorios, Lenexa, KS) es una tarjeta en la que están colocados dos círculos de prueba separados impregnados en reactivos, uno para la detección de la actividad de Prolina amino-peptidasa (PRO), el otro, para la de β -galactosaminidasa (MUGAL). La prueba se realiza simplemente mediante la rehidratación de cada círculo de prueba del sistema con un reactivo provisto del fabricante.

Mediante una varilla aplicadora, cada círculo de prueba luego es inoculado con la porción superior de una colonia bien aislada de la levadura a identificar y la tarjeta incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente.

El círculo PRO está impregnado de L-prolina- β -naftilamida; se desarrolla un color rojo dentro de los 30 segundos después del agregado de un revelador de color provisto por el fabricante, si la levadura posee actividad de Prolina aminopeptidasa. En el círculo MUGAL, impregnado con 4- metilumbeliferil-N-acetil-b-D-galactosamina, se desarrollara una fluorescencia azul brillante dentro de los 30 segundos en el área de inoculación después de que las levaduras poseen β -galactosaminidasa liberan 4- metilumbeliferona. Aunque muchas especies de levaduras pueden mostrar reactividad para una u otra de estas sustancias, sólo *Candida albicans* producirá una reacción positiva para ambas. La prueba solo debe realizarse sólo en colonias bien aisladas de un cultivo puro. Las pruebas en aislamientos de menos de 18 horas de cultivo pueden dar falsas reacciones negativas; las falsas positivas pueden ocurrir si los círculos de reactivos se leen después de los 30 segundos de agregar los reactivos reveladores de color. ¹



Fig.4.6. Sistema BactiCard Candida (Remel). ^{5,6}

Además de BactiCard Candida, existen otros sistemas comercializados que detectan estas enzimas y cuyo procesamiento e interpretación de resultados es muy similar (Tabla 1).

Tabla 1. Sistemas enzimáticos comercializados para la identificación rápida de *C. albicans* utilizando sustratos cromogénicos^{a, 5}

Nombre comercial	Sustrato	Tiempo incubación (Temperatura)
Albicans-Sure (Clinical Standards Labs)	4MU ^c N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	5 min (ambiente)
Albistrip (Lab M. Ltd)	4MU N-acetil galactosaminida Prolina-p-nitroanilida	5 min (37 °C)
BactiCard Candida (Remel)	4MU N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	5 min (ambiente)
RapID Albicans (Biolife)	4MU N-acetil galactosaminida P-dimetilcinnamaldehido	2 h (37 °C)
MUAG test ^b (Biolife)	4MU N-acetil galactosaminida	3 min (ambiente)

a: Detectan β -galactosaminidasa y L prolina aminopeptidasa. Se necesita lámpara de luz ultravioleta

b: Sólo detecta β -galactosaminidasa.

c: Metil Umbeliferil.

2. Sistemas enzimáticos que utilizan un sustrato cromogénico

Estos sistemas utilizan sustratos cromogénicos para detectar las enzimas MUGAL y PRO por lo que no requieren el uso de la lámpara de luz ultravioleta. Entre ellos destacan: **Candida albicans Screen** (Remel) Utiliza como sustratos p-nitrofenil-N-β-acetil β-D galactosaminida y p-dimetilcinnamaldehído. Requiere una incubación de 90 min a temperatura ambiente.

a. Murex *C. albicans* CA50

Utiliza como sustratos p-nitrofenil-N-β-acetil β-D galactosaminida y p-dimetilcinnamaldehído. Requiere una incubación de 30 min a 37°C.⁵

b. Prueba Murex *C. albicans*.

Utiliza una combinación de p-nitrofenil-N-acetil –beta –D-galactosaminida (NGL) y L-prolina-beta-naftilamida (PRO) para identificar *Candida albicans* a partir de medios de cultivo. Los dos reactivos están impregnados en discos de papel filtro desecados. La prueba se realiza por colocación de un disco en un tubo pequeño provisto por el fabricante. El disco se rehidrata con una gota de agua desmineralizada, luego de la cual una pasta visible de una colonia bien aislada de la levadura a probar se fricciona sobre el disco. Se coloca la tapa en el tubo y se incuba durante 30 minutos a 35°C.

Después de la incubación, se le agrega al disco una gota de hidróxido de sodio al 0.3%. Si las levaduras poseen NGL, se desarrollara casi de inmediato un color amarillo. Luego se le agrega el disco una gota del revelador del color provisto por el fabricante. La presencia de actividad PRO se indica por la aparición de un color rojo dentro del minuto.

Si ambas pruebas son positivas, puede presumirse de *C. albicans*; si una o ambas pruebas son negativas, deben realizarse otras para identificar la levadura desconocida.

De la misma manera que con el procedimiento del tubo germinal tradicional, cada una de estas pruebas son reactivo sustrato proporciona presunciones y sirven sólo como parte de un esquema global para realizar una identificación definitiva de las levaduras.¹

D. Identificación basada en métodos de asimilación de nutrientes

1. SISTEMA Uni-Yeast-Tek

Este sistema consiste en una placa sellada con múltiples compartimientos que contiene un medio con agar para la asimilación de hidratos de carbono. También tiene incorporado en una cubeta central agar harina de maíz-Tween 80 este último para determinar el crecimiento micelial y la producción de Clamidosporos. Se provee de agar urea, agar para la asimilación diferencial de nitrato y de manera adicional un caldo extracto de carne al 2.6 con 0.05% de glucosa para realizar la prueba del tubo germinal.

La concentración de hidratos de carbono varía desde el 1 al 4% e incluye sacarosa, lactosa, maltosa, celobiosa, almidón soluble, trehalosa y rafinosa.

Cada uno de los compartimientos se inocula a través de una entrada pequeña sobre un lado de la cubeta con una gota de suspensión en agua destilada de la levadura a probar, tan turbia como el estándar 4 de la escala de Mc Farland. El agar harina de maíz se inocula haciendo dos o tres surcos paralelos con una aguja de inoculación con una porción pequeña de la colonia de la levadura a probar. Un cubreobjeto número 1 esterilizado por flameado se coloca sobre el área de inoculación. La placa plástica se incuba durante 2 a 7 días a 30°C o 35°C. Los compartimientos de asimilación de hidratos de carbono se observan para detectar el cambio de color azul al amarillo (prueba positiva), el medio del nitrato para analizar un cambio de color del azul al verde azulado (reducción de nitratos), y al agar harina de maíz se estudia a través del microscopio para detectar la presencia de hifas y blastoconidias.

La evolución de este producto ha demostrado que es satisfactorio para la identificación de las levaduras que se aíslan con frecuencia. La mayor desventaja del sistema es que se requiere de 7 días para la identificación completa de ciertas levaduras. También tiene un índice de perfiles provisto por el fabricante, generado por una base de datos por computadora.^{1,5}



Fig. 4.7. Sistema Uni-Yeast-Tek

2. AUXACOLOR SYSTEM (Sanofi Diagnostics Pasteur)

Consiste de microplacas de plástico que contiene 16 pozos que contienen 13 azúcares que permite identificar 26 especies diferentes de levaduras.

Los azúcares deshidratados para asimilación por el microorganismo en prueba están en presencia de una solución básica y un indicador de pH púrpura de bromocresol.

Después de la inoculación con la suspensión de levaduras, el desarrollo de los pozos es indicado por turbidez y por cambio de color de azul a amarillo por el ácido que es producido. La tira también contiene pruebas para resistencia a ciclohexamida y para la detección de actividad de fenoloxidasa de *Criptococcus neoformans*.^{2,5}

a. Procedimiento

- 1) Realizar una suspensión, equivalente a 1 McFarland con un cultivo joven (24-48 h) de la levadura a identificar, en el vial con medio de suspensión facilitado por el fabricante.
- 2) Inocular la galería y cubrir con papel adhesivo.
- 3) Incubar a 30°C durante 24-48 h (prolongar hasta 72h si fuese necesario).

b. Interpretación

El cambio de color (amarillo) se interpreta como crecimiento positivo para el azúcar en cuestión. Los 15 caracteres bioquímicos de la galería se agrupan en tripletes para obtener un código numérico. Para ello, se adjudica un valor de 1 para la posición 1ª del triplete, 2 para la 2ª y 4 para la 3ª. La identificación de la levadura se consigue comparando el código numérico resultante con los suministrados por el fabricante.⁶



Fig.4.8 Sistema Auxocolor (Bio-Rad).⁵

E. Identificación rápida de levaduras mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas

1. SISTEMA RAPID PLUS PARA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS. (INNOVATIVE DIAGNOSTIC SYSTEMS NORCROSS, GA)

El RapID Yeast Plus System, comprende un panel de 18 cavidades para reacciones, moldeadas en la periferia de una bandeja plástica descartable.¹ Cada cavidad contiene un sustrato convencional deshidratado o cromogénico que detecta la asimilación de carbohidratos, ácidos orgánicos o aminoácidos, así como la hidrólisis de la urea y de ácidos grasos. Permite identificar hasta 43 especies de levaduras.^(5,3)

a. Procedimiento

Se coloca una suspensión de las levaduras desconocidas a ser probadas, con un líquido provisto por el fabricante, en la bandeja de inoculación, que se introduce en cada una de las cavidades inclinando y agitando el dispositivo para lograr una distribución pareja del inóculo.

Después de incubar el panel a 30°C durante 48 horas, se leen directamente las primeras seis cavidades que contienen hidratos de carbono en busca de un cambio de color. Las cavidades 7-14 se leen después de adicionar un reactivo "A" y las restantes luego de agregar un reactivo "B".

Las reacciones se registran en un formulario de informe especial. De esto deriva un código de ocho dígitos para la interpretación de los resultados positivos y negativos, que se compara con una serie de perfiles numéricos registrados en un libro de compendios de códigos. Este sistema es fácil de usar y ofrece un método rápido y preciso para la identificación de levaduras más significativas en la clínica.

El sistema está ideado para la identificación de aislamientos en cultivos puros, y no puede utilizarse para la prueba directa de los materiales clínicos. Deben seguirse las especificaciones del fabricante con exactitud para obtener resultados óptimos.^{1,5}



Fig. 4.9 Sistema Rapid plus para identificación de levaduras.
(Innovative diagnostic systems norcross)^{5,8}

2. FONGISCREEN 4H

Fongiscreen 4H (Bio-Rad) es un sistema basado en el estudio del perfil enzimático de algunas levaduras, permitiendo identificar en 4 h *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. neoformans*. La utilización de sustratos deshidratados por las enzimas fúngicas se manifiesta por un cambio de color, ya sea espontáneamente o después de añadir un reactivo revelador.

a. Procedimiento

1) Obtener una suspensión de la levadura a identificar a partir de un cultivo joven (24-48 h) en cualquiera de los medios habituales. La turbidez de la suspensión debe ser equivalente a la del testigo suministrado por el fabricante, aproximadamente 4 McFarland.

2) Inocular 3 gotas de la suspensión anterior en cada uno de los 6 pocillos de la microplaca y cubrir con el adhesivo suministrado por el fabricante.

3) Incubar a 37°C durante 4 h.

b. Lectura e interpretación

- 1) La lectura se lleva a cabo mediante la adición de reactivos o por lectura directa.
- 2) Los resultados se interpretan comparando el perfil obtenido con los perfiles específicos suministrados por el fabricante.⁵



Fig. 4.10 Sistema Fongiscreen (Bio-Rad).⁵

F. Sistemas semiautomáticos

1. SISTEMA API 20C

La galería API 20 C AUX (bioMérieux) se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que no se degradan después de periodos prolongados de almacenamiento, permiten realizar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas se inoculan con un medio mínimo semisólido y las levaduras sólo se reproducen si son capaces de utilizar el sustrato correspondiente.

La lectura de estas reacciones se hace por comparación con un control de crecimiento y la identificación se obtiene, a partir de un código numérico, mediante un catálogo analítico o un programa informático.^{1, 3, 5}

a. Procedimiento

1) A partir de un cultivo joven de la levadura a identificar, realizar una suspensión en 2 ml de agua destilada estéril hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.

2) Transferir 100 µl (2 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar evitando la formación de burbujas.

3) Llenar las cúpulas con la suspensión anterior evitando la formación de burbujas y creando un nivel horizontal para generar resultados correctos.

4) Incubar a 30 °C durante 48-72 h.⁵

b. Lectura e interpretación

Los microorganismos sólo crecen en las cavidades en las que se utiliza el hidrato de carbono específico, dando un aspecto turbio en el medio sólido que es

fácil de notar contra las líneas negras impresas en la superficie plástica, detrás de las cavidades.¹

Las reacciones se comparan con la primera cúpula que carece de carbohidratos. La lectura de las reacciones se convierte en un número de siete dígitos que corresponde al perfil del biotipo y la identificación se realiza mediante un registro de perfiles. La base de datos contiene al menos 42 especies. En general, las levaduras pueden ser identificadas en 48 horas; sin embargo, el *Criptomococcus* y el *Trichosporon* pueden requerir hasta 72 h.^{3,7}

Es factible que sea necesario obtener cultivos de sitios múltiples, en particular de muestras de orina, para hacer el diagnóstico en casos sospechosos. Las cavidades son fáciles de inocular con la suspensión de las levaduras a probar.¹

El sistema de identificación de levaduras API 20 C AUX, y todos los otros productos disponibles en el comercio, recurren a las características morfológicas microscópicas del crecimiento de levaduras, en agar harina de maíz con tween 80 al 1% y azul trípiano, junto con los patrones de utilización de los sustratos. Esto es útil sobre todo cuando aparece más de una posibilidad en una identificación y las características morfológicas microscópicas suelen utilizarse para distinguir entre las posibilidades ofrecidas por el registro del perfil. Este sistema tiene la limitación de que no permite identificar las especies no habituales; sin embargo, la mayoría de las observadas en el laboratorio clínico son identificadas con precisión.³

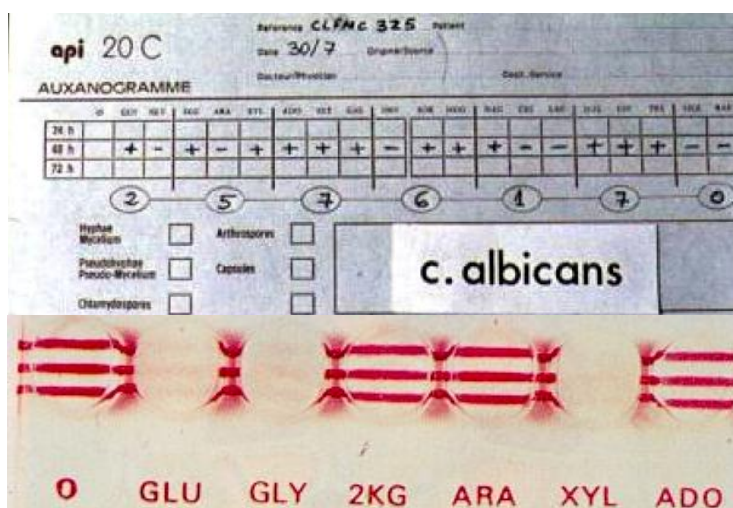


Figura 4.10 Sistema API 20C AUX. La interpretación se efectúa observando la aparición de opacidad en las cámaras que contienen hidratos de carbono como sustratos utilizados por la levadura en estudio. Obsérvese en la fotografía que la segunda, la tercera y la sexta cámara de izquierda a derecha son opacas y virtualmente han obliterado las líneas rojas en el fondo, lo que indica que el microorganismo puede utilizar glucosa, glicerol, y xilol respectivamente y producir un crecimiento visible. (BioMérieux).⁵

2. ATB 32C (API BIOMERIUX OR INNOVATIVE DIAGNOSTIC SYSTEMS)

La galería ID 32 C (bioMérieux) está compuesta por diferentes pruebas de asimilación y por una base de datos especialmente adaptada. Permite identificar 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados y puede ser utilizada manualmente o bien de forma automatizada mediante los sistemas ATB Expression o mini API.

La galería se compone de 32 cúpulas: 29 contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado, una es el control negativo, otra detecta la sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esculina. El procedimiento para la inoculación de la galería, incubación e interpretación es similar al descrito para el sistema API 20 C AUX. La única diferencia es la posibilidad de realizar la lectura de la galería, de forma automática, mediante el sistema ATB Expression o mini API.^{2,5}

a. Procedimiento

1) Realizar una suspensión de un cultivo joven de la levadura a identificar en 2 ml de agua destilada estéril, hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.

2) Transferir 250 µl (5 gotas) de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar.

3) Inoculación manual: Dispensar 135 µl de la suspensión anterior en cada cúpula.

3bis. Inoculación automática: Colocar sobre el portagalerías del inoculador ATB la galería y la suspensión en la ampolla de C Medium; el inoculador realizará automáticamente la homogeneización de la ampolla y el llenado de las cúpulas (135 µl/cúpula).

4) Incubar a 30°C durante 24-48 h.

b. Lectura e interpretación

1) Lectura visual: Observar el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula 0 (testigo negativo). Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados. En esta última, los tests están separados en grupos de tres y se adjudica a cada uno en caso de positividad un valor diferente, 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar; sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico. La identificación se obtiene con el programa de identificación

2) Lectura automática con ATB Expression o mini API: El lector busca en cada cúpula la presencia de crecimiento y transmite los datos al ordenador que, una vez procesados, propone la identificación de la especie.⁵

3. PLACA BIOQUÍMICA PARA LEVADURAS VITEK BIOMERIUX (YBC)

Las tarjetas Yeast Biochemical Card (YBC) del sistema Vitek permiten la identificación de organismos levaduriformes y afines de forma automatizada con el sistema AutoMicrobic System. Por otra parte, el sistema Vitek consta de un módulo con cámara de vacío para inoculación de las tarjetas, un lector/incubador, un sistema automático de manipulación de tarjetas, un fotómetro para medir la densidad óptica, un ordenador central y una impresora. El sistema Vitek permite identificar 36 especies diferentes de levaduras: 16 especies del género *Candida*, 6 *Cryptococcus*, 3 *Rhodotorula*, 2 *Trichosporon*, 3 *Geotrichum*, 2 *Prototheca*, *Hansenula anomala*, *Pichia ohmeri*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*.

El sistema para identificación de levaduras VITEK (YBC) utiliza una placa plástica descartable con pequeños orificios que contiene sustratos deshidratados para probar 26 pruebas bioquímicas convencionales y 4 controles negativos.

a. Procedimiento

1) Realizar una suspensión de un cultivo joven de la levadura a identificar en un tubo con 1,8 mL de solución salina estéril, hasta conseguir una turbidez 2 de McFarland.

2) Introducir la tarjeta y la suspensión de levaduras en el módulo de llenado, para que la inoculación de la tarjeta se realice de forma automática.

3) La placa inoculada después se coloca en una unidad incubadora de lectura (30°C) ideada para detectar la turbidez en cada uno de los orificios cada hora.

4) A las 24 h, la lectura de la turbidez de las celdillas se realiza automáticamente y son transferidas electrónicamente a uno de los archivos de la computadora.

b. Interpretación

1) Una vez que el patrón de las lecturas de turbidez se compara con los perfiles de la base de datos, se imprime la identificación del microorganismo.

2) Una identificación aceptable es la que alcanza una confiabilidad 85%. Las levaduras identificadas con menos del 85% de confiabilidad deben ser evaluadas posteriormente valorando su morfología y otras pruebas suplementarias para lograr una identificación aceptable.^{1, 2, 3}

El YBC se comparó con resultados desfavorables en la identificación de *Candida tropicalis*, *C. kruseii*, especies de *Trichosporon*, y criptococos no *C. neoformans*.

Se recomienda la evaluación de la morfología de la colonia sobre el agar harina de maíz o su equivalente como control de calidad en todos los aislamientos identificados por los sistemas comerciales.^{1, 5}

Con este sistema no es necesario identificar las levaduras productoras de tubos germinales.³

G. Sistemas automáticos

1. SISTEMA Vitek 2

El sistema Vitek 2 (bioMérieux) es un sistema totalmente automático para la detección del metabolismo fúngico que puede identificar levaduras y organismos afines en tan sólo 15h. Está basado en tecnología de fluorescencia y se compone de las tarjetas de análisis con 63 pocillos, una consola satélite para la recogida de información, un módulo incubador, un módulo principal donde se procesa la información gracias a un software de análisis y un sistema experto avanzado.

El sistema Vitek 2 permite la identificación de 51 especies diferentes, incluida *C. dubliniensis*, y, al igual que los sistemas semiautomáticos, requiere pruebas adicionales (fundamentalmente morfológicas) en caso de baja discriminación.

a. Procedimiento

1. A partir de un cultivo joven de la levadura a estudiar, preparar una suspensión en solución salina (0,45%), ajustándola a la escala 2 de McFarland.

2. La inoculación de las tarjetas, el sellado y la incubación (30 °C) se realiza de forma totalmente automatizada.

3. A las 15 h se realiza la lectura e interpretación de los resultados, también de forma automática.⁵

2. Panel de identificación Rapid Yeast (Dade Microscan)

Se basa en perfiles para enzimas específicas para muchas de las levaduras encontradas con frecuencia en el laboratorio de microbiología clínica.

Constituida de compuestos cromogénicos y pruebas convencionales modificadas para la identificación de levaduras y organismos semejantes a las levaduras. La placa formada por 96 pozos, contiene 27 sustratos cromogénicos deshidratados, que son designados para la identificación de levaduras.^{2, 3,5}

a. Procedimiento

1) A partir de un cultivo joven (18-24 h) en SDA, realizar una emulsión en 3 ml de agua destilada hasta conseguir la turbidez del Patrón MicroScan (aproximadamente 7-8 de la escala de McFarland).

2) Añadir, de forma automatizada, 50 µl de la suspensión anterior a cada uno de los pocillos que contienen sustratos y a los pocillos controles.

3) Cubrir el panel e incubarlo en atmósfera de CO₂ a 35-37°C durante 4 h. antes de que sean interpretadas las reacciones.^{2,5}

b. Lectura e interpretación

1) Añadir los reactivos correspondientes a cada pocillo, incluyendo los controles.⁸

2) Las lecturas cromogénicas pueden leerse manualmente o con el equipo Autoscan. El perfil bioquímico se encuentra cuando los resultados son transformados en un número biotipo de 9 dígitos, que es comparado con la base de datos del instrumento Autoscan o manualmente. Cuando la probabilidad de identificación no es suficiente para confirmar la identificación es recomendable suplementar las características fenotípicas y morfológicas.^{2, 14}

3. Sistema Biolog YT MicroPlate

El sistema Biolog YT MicroPlate (Biolog) permite la identificación de organismos levaduriformes mediante 94 pruebas bioquímicas, llegando a identificar hasta un total de 267 especies diferentes pertenecientes a 53 géneros.⁵

RESUMEN

Los hongos pueden ser agentes patógenos directos sobre el ser humano, son causantes de numerosas micosis con riesgo para la salud.

Los sistemas para la identificación de hongos se basan en criterios enzimáticos, inmunológicos y asimilación de nutrientes.

Se tienen los sistemas al alcance en el laboratorio, pero no se debe pasar por alto el examen directo ya que proporciona un diagnóstico presuntivo inmediato para el médico, además ayuda en la selección del medio de cultivo apropiado. Al obtener una posible identificación de un hongo patógeno (Mucormicosis) se debe informar lo más pronto posible al médico de manera que pueda instituir un tratamiento antimicótico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. España: Editorial Panamericana.1999
2. Truant L Allan. Manual of Comercial Methods in Clinical Microbiology. United Status of America: Washington, D.C; 2002
3. Forbes A Betty, Sahm Daniel F, Weissfeld Alice S. Diagnóstico Microbiológico. 11ª ed. Madrid España: Médica Panamericana; 2004.
4. Dr. A. Rambach [sede Web] Paris, Francia: CHROMagar; 2005 [acceso 13 de Mayo de 2007].The Pioneer of Chromogenic Media; [actualizada el 21-Agost-2006]; [pags.2]. Disponible en: www.chromagar.com
5. Linares Sicilia María José, Solís Cuesta Francisco. Identificación de Levaduras. Revista Iberoamericana de Micología [revista en Internet] 2001. [acceso 19 de octubre de 2005]; Capitulo 11. pg.11.1-11.18 Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>
6. REMEL [sede Web]. U.S.A: REMEL; 2008 [fecha de actualización: 2008 [acceso: 28 de Enero de 2008] Diagnostic Tests. System Rapid NF and MicroID. Disponible en: <http://www.remelinc.com>
7. Finegold Sydney M, Baron Ellen J. Diagnóstico Microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana; 1996.

8. Frank c. Odds y Ria Barnaerts. CHROmagar Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important Species. Journal of Clinical Microbiology [revista en Internet] Aug. 1994. [Acceso 31 de Mayo 2007] Volumen 32 (No.8): [pg.1923-1929]. Disponible en: [Department of Bacteriology and Mycology, Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium. http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/32/8/1923](http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/32/8/1923)
9. José Pontón. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev Iberoam Micology [revista en Internet] 2002. [Acceso 31 de Mayo 2007]; volumen (19): [pg.25-29]. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/025029.pdf>
10. Caroline M. O'Hara. Manual and Automated Instrumentation for Identification of *Enterobacteriaceae* and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. [revista en Internet] Jan. 2005. [acceso 31 de Mayo 2007]; Vol. 18, (No. 1): [pg. 147–162]. Disponible en: <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/18/1/147>
11. Prescott Lansing M., Harley John P, Klein Donald A. Microbiología. 4ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 1999.12
12. López Martínez R, Méndez Tovar L, Hernández Hernández F. Micología Médica. México D.F: Trillas; 1995.
13. Koneman, Elmer W.K, Gleen D. Roberts. Diagnóstico Microbiológico. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1987.
14. Dade Behring [sede Web]. USA: Dade Behring,; 2000 [acceso: 20 de Mayo de 2007]. MicroScan Rapid Yeast Identification Panel Procedure Manual package insert [pag.1-12]. Disponible en: www.dadebehring.com

V. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD PARA LEVADURAS

Las infecciones fúngicas han incrementado durante las dos décadas pasadas causando formidable morbilidad y mortalidad especialmente en pacientes inmunocomprometidos, así mismo como en pacientes con SIDA. La frecuencia de infecciones fúngicas nosocomiales también tiene incremento en Pacientes con cáncer, trasplante de órganos, con quemaduras y cirugías.

Durante mucho tiempo, por razones fundamentalmente técnicas, ha existido gran incertidumbre sobre el valor del antifungigrama para determinar las concentraciones inhibitorias de los antifúngicos y, por tanto, para orientar el tratamiento. En los últimos años se ha progresado en la estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos lo que ha permitido obtener resultados más reproducibles y comparables entre laboratorios y secundariamente efectuar estudios clínicos multicéntricos que han facilitados la interpretación de los resultados in vitro en relación con la eficacia del antifúngico en el tratamiento.

Debido a las consecuencias de estas infecciones que llevan hasta la muerte del paciente y reportes que se han llevado a cabo de la resistencia a los medicamentos, las pruebas de susceptibilidad para levaduras patógenas son muy importantes.

Sin embargo las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos aun tienen algunos problemas metodológicos y limitaciones en cuanto a los puntos de corte establecidos

A pesar de ello el antifungigrama es de gran utilidad al permitir confirmar la sensibilidad esperada de los hongos aislados en clínica o poder detectar la adquisición de resistencias en el curso de tratamientos prolongados con algunos antifúngicos.¹

A. FUNGI-TEST BioRad)

Método colorimétrico basado en el CLSI M-27-A. El sistema Fungitest consiste en una galería con pocillos que incorporan concentraciones discriminantes para conocer la sensibilidad a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol 5-fluorocitosina y miconazol. Los pocillos se inoculan con suspensiones de 10³ UFC/ml. El método utiliza RPMI 1640 como medio de cultivo pero la determinación de la sensibilidad, el método es cualitativo no cuantitativo. Cada placa tiene 2 concentraciones diferentes en pocillos individuales. Para la anfotericina B se emplean 2 y 8 µg/ml; para 5-fluorocitosina 2 y 32 µg/ml; para fluconazol 8 y 64 µg/ml; 0,5 y 4 para itraconazol y ketoconazol; 0,5 y 8 µg/ml para miconazol.

Los pozos también contienen un indicador del redox para mejorar la legibilidad de punto final por un cambio del color de azul a rosa. Los Resultados se expresan categorizando la sensibilidad de las cepas en sensibles, intermedias o resistentes.^{2,3}

FUNGITEST



a)

Resultados de *Candida krusei*

+ Control
 Fc= 14-32 $\mu\text{g/ml}$
 AmB= S < 2 $\mu\text{g/ml}$
 Mico= 11-8 $\mu\text{g/ml}$
 Keto= S < 0.5 $\mu\text{g/ml}$
 Itra= S < 0.5 $\mu\text{g/ml}$
 flu= SDD 16-32 $\mu\text{g/ml}$
 - Control



b)

Fig. 5.1 a) Sistema Fungitest. b) Prueba realizada a *Candida krusei*²

B. E-Test (AB Biodisk)

1. DESCRIPCIÓN

Etest para pruebas de susceptibilidad de *C. albicans*, *Candida sp.* y *Cryptococcus neoformans*. Etest Combina los conceptos de difusión en agar y dilución. Éste es un método de difusión de agar que usa una tira con un gradiente de concentración predefinido del agente antimicrobial a probar. Este gradiente permite la determinación de la MIC. Se han usado Etest extensivamente para ensayos de susceptibilidad de bacterias y también están disponibles para agentes anti fúngicos, incluso Amfotericina B (el rango 0.002-32 mg/ml), Ketoconazol (el rango 0.002-32 mg/ml), Itraconazol (el rango 0.002-32 mg/ml), Fluconazol (el rango 0.016-256 mg/ml), Voriconazol (el rango 0.002-32 $\mu\text{g/ml}$) y 5-Fluorocytosine (el rango 0.002-32 mg/ml) (fig. 3). Las dos dificultades con Etest contra los hongos siempre han sido el medio para usar y la interpretación del punto final. Si persiste

el problema se recomienda modificar el agar RPMI-1640 complementado con 0.2% glucosa como lo indica el estándar de la CLSI. Pueden probarse los antifúngicos individuales y hay correlación razonable con la norma de CLSI. La lectura del punto final solo se dificulta con el 20% de las levaduras.^{2, 15}

2. MÉTODO

- Inoculación y preparación:

Candida sp: Suspender bien colonias aisladas (en agar Dextrosa Sabouraud de 24 horas) en 0.85% NaCl para obtener una turbidez de 0.5 McFarland.

Cryptococcus neoformans: Usar colonias de 48-72 horas de aislamiento y obtener una turbidez de 1 McFarland.

Sumergir un algodón estéril (no girar demasiado fuerte) dentro de la suspensión del inóculo y presionar por el exceso de fluido. Ó dispensar aproximadamente 200µl por el centro de una placa de 90mm o aproximadamente 400µl para una placa de 150mm.

Limpiar cuidadosamente en tres direcciones para obtener un desarrollo uniforme completamente sobre la superficie del el agar. Permitir que la humedad lo absorba por lo menos 15 minutos.

Con un aplicador de Etest o una pinza estéril, coloque las tiras de Etest en la placa de agar inoculada seca, orientadas como se muestra en la Figura 5.2. Asegúrese de que los valores impresos en la tira de la CIM estén colocados hacia arriba [la superficie del reverso de la tira que contiene el gradiente de antimicrobiano debe estar en contacto con el agar].

Una vez colocadas, no mueva las tiras de gradiente antimicrobiano. Usar una plantilla para colocar 5 tiras sobre una placa de 150mm o 1-2 tiras sobre una placa de 90mm.

- Incubación:

Cryptococcus neoformans y *Candida* sp: A 35°C en una incubadora húmeda hasta que el crecimiento se vea claramente después de 24 a 48 horas.

- Observaciones importantes:

Sacar las placas húmedas antes de la inoculación.

Asegúrese que la superficie del agar inoculado este completamente seco antes de aplicar las tiras.

No mueva las tiras una vez aplicadas.

- Lectura

Cuando el desarrollo es claramente observado después de incubarse una noche o más tiempo. La CMI viene determinada por la intersección entre la línea de división del hongo y la tira de épsilon test.^{4, 5}



Fig. 5.2. Se puede colocar hasta dos tiras de Etest en una placa de 100nm o hasta cinco tiras de Etest en una placa de 150nm.^{6,7}

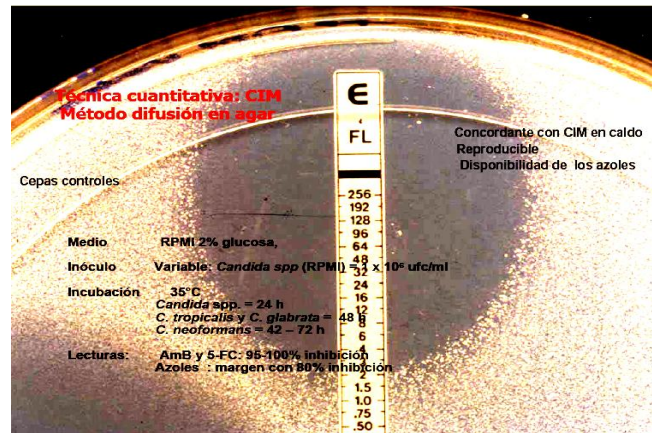


Fig.5.12. Tira E-Test²

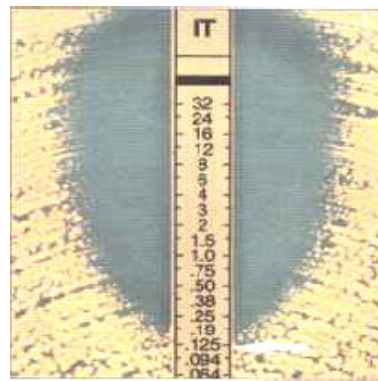


Fig. 5.3 Itraconazol: Punto final se observa claro. MIC 0.125 μ g /ml.

C. Sensititre Yeastone

El sistema Sensititre Yeast One se basa en una técnica de microdilución en medio líquido RPMI 1640 con glucosa que contiene un indicador de pH (azul Alamar) que permite determinar la sensibilidad *in vitro* de forma cuantitativa y por medio de un cambio colorimétrico a cinco antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, ketoconazol y 5-fluorocitosina). Es un método poco laborioso, estandarizado con un gran paralelismo con respecto al método descrito en el documento M27-A de la CLSI en referencia a una gran mayoría de variables

experimentales. En la práctica, puede ser utilizado para la determinación de la sensibilidad tanto de levaduras como de hongos filamentosos. No obstante para estos últimos, tanto por las sustancias incluidas como por la utilidad crítica de los resultados propia de este tipo de hongos, hace poco útil su uso de forma rutinaria e indiscriminada. La laboriosa preparación de las diluciones de los fármacos y del inóculo características del método de referencia M27-A para levaduras y M38-P para hongos filamentosos, está automatizada en Sensititre Yeast One, por lo que se eliminan algunas limitaciones técnicas. Las distintas concentraciones de antifúngico (diluciones dobles seriadas) usadas en la placa de forma individual para un solo aislamiento, vienen ya preparadas en la placa de forma deshidratada.

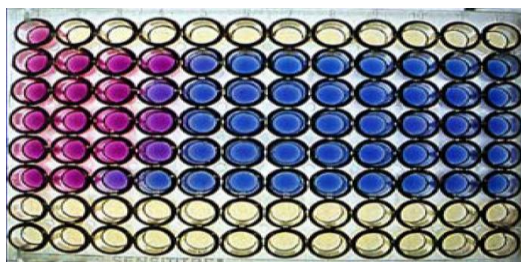
Una de las características más importantes de Sensititre Yeast One radica en la posibilidad de incorporar nuevos antifúngicos, a diferencia de otros sistemas mucho más rígidos, en la medida que sustancias como voriconazol, posaconazol, ravuconazol o caspofungina entre otros, vayan siendo introducidos en la clínica. La adición posterior del medio de cultivo en el que ya figura la suspensión de inóculo, permite la disolución de la concentración final de antifúngico correspondiente y del indicador de pH.

El inóculo se ajusta turbidimétricamente y el tamaño empleado del mismo coincide con el del documento M27-A (Tabla 1). La lectura de los resultados, es decir la determinación de las CMI, se realiza observando la variación de color del azul de Alamar que está asociado al desarrollo del inóculo, permite la determinación de manera más clara de los puntos de corte, en comparación con la turbidimétrica. Ello reduce la influencia del efecto de arrastre característico de los antifúngicos azólicos en los métodos de dilución sobre la interpretación de los resultados. Las concentraciones de antifúngico también coinciden con las utilizadas con el método de referencia y los puntos de corte para anfotericina B, fluconazol y 5-fluorocitosina son también los mismos, aunque en este caso esos mismos criterios se generalizan para otros géneros de levaduras y de distintas procedencias.

La utilización del medio de cultivo RPMI 1640 tamponado con MOPS (pH 7), es un punto en común con el método de referencia, aunque la adición de glucosa en Sensititre Yeast One constituye una diferencia que facilita un menor tiempo de incubación y también la lectura. Sin embargo, la adición de glucosa al medio de cultivo, no parece ser adecuada para poner en evidencia las resistencias *in vitro* a la anfotericina B. No obstante, la aparición de resistencias clínicas a anfotericina B es tradicionalmente baja en levaduras y su observación *in vitro* debe poder estar asociada a un fracaso terapéutico para considerarse como una resistencia real, por lo que la modificación del medio de cultivo no puede suponer más ventajas que problemas. En esta línea, existen alternativas como la del Antibiotic Medium 3 que permite discriminar las resistencias que son obtenidas en medio RPMI 1640, siendo ésta otra de modificaciones hechas al documento M27-A que tiene una utilidad totalmente establecida.

Según los datos obtenidos Sensititre Yeast One se pudo clasificar como resistentes a un 93% de cepas de *C. albicans* y al 100% de *C. glabrata* para fluconazol y el 50% y 90% respectivamente para itraconazol.^{3,16}

AmB 0.008-16
 Flu 0.125-256
 Itra 0.008-16
 Keto 0.008-16
 5Fc 0.03-64



CMI
 0.125
 1.0
 0.125
 0.125
 0.18

Fig. 5.13 SENSITITRE YeastOne

Prueba de Dilución en Microcaldo CMI *Candida albicans*.²

D. ASTY colorimetric panel

ASTY colorimetric panel es un sistema de determinación de la sensibilidad en tiras de pocillos que contienen previamente deshidratadas las concentraciones de antifúngico a ensayar. Cuatro son los antifúngicos de trabajo (anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol e itraconazol), en rangos de concentración similares a los utilizados en el método de microdilución del CLSI de referencia.

De este modo, ambos métodos son igualmente paralelos en cuanto a ejecución y únicamente la presencia de un indicador colorimétrico de pH constituye una diferencia. Este indicador de color permite determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los antifúngicos cuando se produce el viraje de color de azul, sin crecimiento a púrpura con inhibición del crecimiento y rojo cuando se ha desarrollado el inóculo. El sistema permite la incorporación de los nuevos antifúngicos en la medida que estos estén disponibles.

En la valoración del método con cepas de colección de control de calidad del CLSI, se obtuvo una excelente correlación con respecto al método de referencia. Los valores dependieron del antifúngico y únicamente para itraconazol los resultados fueron una dilución mayor con respecto al método de referencia, siendo la correlación entre ambos del 95% para la *C. parapsilosis* ATCC 22019 y del 100% para la *C. kruseii* ATCC 6258. La reproducibilidad del método estudiada con cepas de referencia dependió del período de incubación oscilando entre el 77% y el 99% de las CMI leídas a 24 h que estaban dentro del rango de tres CMI. Ese porcentaje pasaba al 83%-100% a las 48 h de incubación en cada cepa estudiada. Para las cepas de origen clínico evaluadas, la comparación entre el sistema ASTY y el de referencia para los cuatro antifúngicos fue del 93% con CMIs de ASTY a 24 h y del 96% con CMIs de ASTY a 48 h (Tabla 2). Al igual que con las cepas de referencia la valoración del método depende del antifúngico empleado y el período de incubación siendo mejor a las 48 h. Al igual que en resto de métodos comercializados, la concordancia también parece depender del género y de la especie de levadura. En todos los casos las discrepancias se atribuyeron a la presencia de bajas CMI o fuera del rango inferior de concentración de antifúngico obtenida mediante el sistema ASTY.^{2,3}

AUTOMATIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

Tabla 1. Comparación de las distintas variables experimentales utilizadas en los distintos métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad a los antifúngicos y el métodos de referencia M27-A del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

	NCCLS M27-A	Sensititre® Yeast One	FUNGITEST®	ASTY®
Antifúngicos	Abierto	AMB, FLZ, ITZ, KTZ, 5FC Abierto	AMB, FLZ, ITZ, KTZ, 5FC, MCZ	AMB, 5FC, FLZ, ITZ Abierto
Rango de concentraciones	Referencia	NCCLS M27-A	Dos concentraciones	NCCLS M27-A
Medio Cultivo	RPMI 1640	RPMI 1640 glucosado (2%)	RPMI 1640	RPMI 1640
pH	MOPS / 7	MOPS / 7	MOPS / 7	MOPS / 7
Inóculo (UFC/ml)	5x10 ² -2,5x10 ³	1,5-8x10 ³	10 ³	5x10 ² -2,5x10 ³
Temperatura	35 °C	35 °C	37 °C	35 °C
Incubación	24-48 h	24-48 h	24-48 h	24-48 h
Lectura	Visual Turbidimétrica	Visual Colorimétrica	Visual Colorimétrica	Visual Colorimétrica
Interpretación	Referencia	NCCLS M27-A	Propia	NCCLS M27-A
Automatización	No / Posible	Siembra	No	Posible

AMB = anfotericina B; FLZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; KTZ = ketoconazol; 5FC = 5-fluorocitosina; MCZ = miconazol.

Tabla 2. Resultados comparativos (porcentajes de acuerdo) de la concordancia entre los distintos métodos comercializados para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos y el método de referencia M27-A del *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), publicados por distintos autores para diferentes géneros y especies de levaduras.

Organismo	Antifúngico	Sensititre Yeast One [40]		Fungitest [27]		ASTY [26]	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>Candida albicans</i>	AMB						
		97	97	100	nd	99	99
	5FC	87	56	98	nd	92	98
	ITZ	89	54	98	nd	91	96
	FLZ	87	60	94	nd	95	95
	KTZ	90	56	88	nd	nd	nd
<i>Candida glabrata</i>	AMB	85-97	92-99	100	nd	98	100
	5FC	92-99	73-100	100	nd	95	99
	ITZ	93-100	66-97	56	nd	93	98
	FLZ	95-98	73-99	38	nd	96	100
	KTZ	93-100	66-97	44	nd	nd	nd
<i>Candida krusei</i>	AMB	85-97	92-99	100	nd	83	100
	5FC	92-99	73-100	80	nd	48	100
	ITZ	93-100	66-97	70	nd	91	100
	FLZ	95-98	73-99	75	nd	85	100
	KTZ	93-100	66-97	75	nd	nd	nd
<i>Candida parapsilosis</i>	AMB	85-97	92-99	100	nd	89	100
	5FC	92-99	73-100	100	nd	99	99
	ITZ	93-100	66-97	100	nd	81	98
	FLZ	95-98	73-99	100	nd	99	100
	KTZ	93-100	66-97	100	nd	nd	nd
<i>Candida tropicalis</i>	AMB	85-97	92-99	100	nd	100	97
	5FC	92-99	73-100	100	nd	92	99
	ITZ	93-100	66-97	75	nd	90	67
	FLZ	95-98	73-99	90	nd	94	70
	KTZ	93-100	66-97	75	nd	nd	nd
<i>Cryptococcus neoformans</i>	AMB	nd	76	100	nd	nd	nd
	5FC	nd	96	100	nd	nd	nd
	ITZ	nd	96	100	nd	nd	nd
	FLZ	nd	98	70	nd	nd	nd
	KTZ	nd	90	95	nd	nd	nd
Global	AMB	nd	90-99	100	nd	96	99
	5FC	nd	nd	95	nd	90	99
	ITZ	nd	nd	83	nd	90	92
	FLZ	nd	nd	76	nd	94	95
	KTZ	nd	nd	77	nd	nd	nd

AMB = anfotericina B; FLZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; KTZ = ketoconazol; 5FC = 5-fluorocitosina; MCZ = micónazol.
nd = no determinada.

3

RESUMEN

Las pruebas de sensibilidad de antifúngicos tiene la finalidad de determinar que tan resistente es el hongo a determinado antifúngico, guiar al médico para que prescriba un tratamiento adecuado y evitar que las enfermedades infecciosas generen resistencia.

Los sistemas utilizados para la determinación de sensibilidad de antifúngicos se basan en la colorimetría con indicador de pH, turbidimetría y respecto al gradiente de concentración. Si la determinación de la sensibilidad es cualitativa se interpreta como sensible, intermedio y resistente, cuando el método es cuantitativo se determina la concentración mínima inhibitoria que significa que es la mínima concentración de antifúngicos que inhibe el desarrollo microbiano.

Las pruebas requieren de una estandarización del medio de cultivo, del inóculo bacteriano, de la temperatura, el tiempo de incubación y la interpretación de resultados para obtener resultados precisos y confiables.

BIBLIOGRAFÍA

1. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. España: Editorial Panamericana.1999
2. Truant L Allan. Manual of Comercial Methods in Clinical Microbiology. United Status of America: Washington, D.C; 2002.
3. Alfonso Javier Carrillo-Muñoz, Lourdes Abarca, Guillermo Quindós. Métodos colorimétricos para la determinación de la sensibilidad in vitro a los antifúngicos. Rev Iberoam Micology [revista en Internet] 2001; [Acceso 31 de Mayo 2007]; volumen (19): [pg.150-155].Disponible en:<http://www.aspergillus.org.uk/secure/articles/Revantifungal.pdf>
4. AB Biodisk [sede Web]: AB Biodisk; 2007 [acceso: 15 de Julio de 2007]. Antifungal Susceptibility for Testing of Yeast [1-2paginas]. Disponible en: www.abbiodisk.com.
5. AB Biodisk [sede Web]: AB Biodisk; 2007 [acceso: 15 de Julio de 2007]. Technical guide 4B Antifungal Susceptibility Testing of Yeast [1-4paginas]. Disponible en: www.abbiodisk.com.
6. AB Biodisk [sede Web]: AB Biodisk; 2007 [acceso: 15 de Julio de 2007]. Technical guide 2B Templates for Application of Etest Strips[1-2paginas]. Disponible en: www.abbiodisk.com.
7. Ajello Gloria, Cheryl Bopp, John Elliott, Richard Facklam. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos Patógenos Bacterias de Importancia para la Salud Pública en el mundo en desarrollo. Organización Mundial de la Salud y Centro Nacional para las Enfermedades Infecciosas [sede Web] 2004; [Acceso 31 de Mayo 2007]; Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_RMD_2003.6_spa.pdf
8. Forbes A Betty, Sahm Daniel F, Weissfeld Alice S. Diagnóstico Microbiológico. 11ª ed. Madrid España: Médica Panamericana; 2004.
9. Linares Sicilia María José, Solís Cuesta Francisco. Identificación de Levaduras. Revista Iberoamericana de Micología [revista en Internet] 2001. [acceso 19 de octubre de 2005]; Capitulo 11. pg.11.1-11.18 Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>
10. Finegold Sydney M, Baron Ellen J. Diagnóstico Microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana; 1996.
11. José Pontón. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev Iberoam Micology [revista en Internet] 2002. [Acceso 31 de Mayo 2007]; volumen (19): [pg.25-29]. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/025029.pdf>
12. Prescott Lansing M., Harley John P, Klein Donald A. Microbiología. 4ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 1999.
13. López Martínez R, Méndez Tovar L, Hernández Hernández F. Micología Médica. México D.F: Trillas; 1995.
14. Koneman, Elmer W.K, Gleen D. Roberts. Diagnóstico Microbiológico. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1987.
15. Prats Guillem. Microbiología Clínica. España: Editorial Médica Panamericana, S.A; 2006.
16. TREK Diagnostic systems, inc [sede Web]: TREK Diagnostic systems; 2004 [Acceso: 9 de Febrero de 2008]. Sensititre Yeast One Now Available with Caspofungin (Cancidas) [4paginas]. Disponible en: <http://www.rapidmicrobiology.com/news/679h2.php>

VI. SISTEMAS AUTOMATIZADOS PARA IDENTIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS

En la actualidad se dispone de tres sistemas de micobacterias semiautomatizados y automatizados: el sistema radiométrico BACTEC aceptado y probado por el tiempo, el recientemente introducido sistema no radiométrico MBBact (Organon Teknica Dirham) y el sistema ESP Myco (Disco Laboratorios, Detroit, Michigan). Dos alternativas posibles para los laboratorios sin sistemas automatizados son el método manual Septi-Chek System (BBL) y el sistema MGIT (Becton Dickinson).¹

A. Sistema BACTEC 460(Becton Dickinson Diagnostic Systems)

Sistema de detección y pruebas de sensibilidad de micobacterias. El sistema BACTEC 460TB fue el primer sistema automatizado para pruebas de micobacterias.

El BACTEC 460TB provee al laboratorio la detección, diferenciación y comprobación de susceptibilidad a las cinco drogas primarias preescritas para tratar la tuberculosis: isoniacida, rifampina, estreptomycin, ethambutol y PZA. El sistema puede ser usado con cualquiera de los dos medios 12B suplementado con PANTA o los medios de 13A únicamente para sangre. Los medios son incubados a 37°C y es probado en el instrumento periódicamente durante el período de incubación de 6 semanas.²

1. FUNDAMENTO

Semiautomatizado y radiométrico. Utiliza un medio de cultivo que contiene ácido palmítico con ¹⁴C marcado. Si se encuentran en el caldo, las micobacterias metabolizan los sustratos marcados con ¹⁴C y liberan CO₂ con marca radiactiva a la atmosfera, que se acumula por encima del caldo en la botella. Se determina el desarrollo a través de la cantidad de dióxido de carbono (CO₂) marcado con ¹⁴C liberado. El instrumento retira esta atmósfera, que contiene CO₂ y mide la cantidad de radiactividad, denominado índice de crecimiento, superior o igual que 10.³ Para cada fármaco estudiado se siembra un inculo estandarizado en un tubo que contiene el fármaco y en otro libre del él. Luego se compara la velocidad y la cantidad de CO₂ producido en ausencia del fármaco y en presencia de él.¹

2. DESCRIPCIÓN

Los componentes del sistema automatizado BACTEC 460 incluyen un contador de centelleo, un conjunto de agujas de aspiración y un riel móvil en el que pueden colocarse hasta 60 botellas de cultivo. El riel es alineado de modo que cada botella de cultivo pasa por turno bajo el conjunto de agujas de aspiración a una velocidad de aproximadamente una cada 80 segundos. Cuando la botella problema está justo debajo del conjunto de agujas, la aguja es introducida a través del tapón de goma en el espacio de la cabeza. Se aspira una muestra del gas de la cabeza y se libera a la cámara del contador del centello.

El gas de la cabeza es reemplazado con un bolo fresco de CO₂ al 10% inmediatamente después que la muestra es aspirada. El instrumento está equipado con una campana que proporciona aire filtrado por filtros HEPA bajo presión negativa en el área de prueba y una fuente de luz UV como características de seguridad adicionales. La aguja es esterilizada por calor electrotérmico durante el intervalo previo a que se tome la muestra de la próxima botella.

La botella del caldo de cultivo BACTEC 12B es la clave para la operación. Consiste en un frasco ampolla de vidrio de 20mL con un cuello corto, la boca del cual se sella con un fino tapón de goma. Contiene 4mL de medio de cultivo líquido que consiste en un base de Middlebrook 7H9, BSA, hidrolizado de caseína, catalasa y estearato de polixileno como enriquecedores del crecimiento, pequeñas cantidades de una mezcla antimicrobiana de poliximina B, anfoteracina B, ácido nalidíxico, trimetoprima y azlocilina para evitar el crecimiento de contaminantes y ácido palmítico marcador con ¹⁴C como detector del crecimiento.

El frasco ampolla se inocula con 0.5ml de la muestra procesada y se coloca en una estufa a 35°C. Si hay micobacterias en el inóculo se libera CO₂ en el espacio de la cabeza y la cantidad de éste refleja directo la cantidad de crecimiento en el frasco ampolla. Se utiliza un sistema detector de radiactividad muy sensible debido a que el metabolismo muy lento de las micobacterias produce solo cantidades mínimas de CO₂. Cuando ha pasado un periodo designado de tiempo de incubación, en general de unos 3 días, los frascos ampolla se colocan sobre el riel del instrumento BACTEC 460 separado para lecturas. La cantidad de radiactividad se mide en el gas aspirado de la cabeza, el cual es traducido a un valor numérico denominado índice de crecimiento (IC). Un índice de crecimiento mayor de 10 se considera positivo; no obstante, deben de realizarse coloraciones para ácidos resistentes de una pequeña alícuota del caldo, ya que otras bacterias pueden vencer la actividad la inhibición antibiótica.

El tiempo de detección para *M. tuberculosis* promedia de 9 a 14 días; puede ser de menos de 7 días para algunas cepas de micobacterias diferentes de *M. tuberculosis*.

Las desventajas del sistema incluyen el costo de los instrumentos, la imposibilidad de observar la morfología de las colonias y detectar cultivos mixtos, el sobrecrecimiento por contaminantes, la necesidad de desechar materiales radiactivos y el uso de muchas agujas. Se ha comunicado casos de infeccionesseudomicobacterianas cuando la aguja es esterilizada incompletamente después de la aspiración de un frasco ampolla con un alta concentración de microorganismos. Las muestras procesadas con otros reactivos distintos del NALC-NaOH (como cloruro de benzalconio o el Zephiran-fosfato trisódico) no se pueden emplear con el sistema BACTEC debido a que las cantidades residuales en el caldo inhiben potencialmente el desarrollo de las micobacterias.

Los estudios iniciales de la sensibilidad de este sistema en cuanto al monitoreo del crecimiento de micobacterias mostraron que se podía detectar un inóculo de 12 a 13 días, mientras que si se esperan 14 a 17 días, se puede detectar cantidades tan pequeñas como 20 bacilo viables.

Una ventaja adicional del sistema BACTEC es la capacidad de realizar estudios rápidos de susceptibilidad a las drogas antimicobacterianas.

El instrumento BACTEC también se puede utilizar para diferenciar *M. tuberculosis* y *M. bovis* de las micobacterias no tuberculosas mediante el empleo de frascos ampolla de cultivo de sangre con *p*-nitro-acetilamino hidroxipropiofenona (NAP). *M. tuberculosis* y *M. bovis* no pueden desarrollar en medios de cultivos de sangre con NAP y, por lo tanto, no pueden producir un IC positivo después de varios días de incubación.¹



Fig. 6.1 Sistema Bactec 460 (Becton Dickinson Diagnostic Systems).²

B. Sistema de detección de micobacterias MB/Bact. (Organon Teknika).

El MB/Bact es un sistema automatizado para detectar micobacterias, similar en diseño al sistema para cultivo de sangre BacT/Alert. Las botellas para procesamiento -MB/Bact Process Bottles contienen 10mL de caldo Middlebrook 7H9 enriquecido en una atmósfera de CO₂, nitrógeno y oxígeno bajo vacío. Por esta razón, esta botella proporciona las condiciones nutritivas y ambientales adecuadas para recuperar las especies de *Micobacterium* encontradas con más frecuencia en las muestras clínicas distintas a la sangre.

Se agrega medio mililitro del suplemento antibiótico reconstituido para micobacterias (MAS) que contienen anfotericina B, azlocilina, ácido nalidíxico, polimixina B, trimetoprima y factores de crecimiento patentados a cada botella justo antes de usarlas para aumentar el desarrollo de especies de *Micobacterium* y reducir el de las bacterias contaminantes que pueden sobrevivir al procedimiento de descontaminación y concentración. El fondo de cada botella de caldo está cubierto con un sensor permeable al gas que cambia de verde oscuro a amarillo brillante cuando se produce CO₂ en el caldo por el metabolismo de las micobacterias. Las botellas se colocan paradas dentro de los orificios individuales en la cámara incubadora, y se utiliza luz reflejada para monitorear continuamente la producción de CO₂ generada por las bacterias.

A pesar de los ensayos de campo multicéntricos patrocinados por los fabricantes indican que el sistema MB/Bact recupera un porcentaje más alto de micobacterias con menos tiempo de la detección en comparación con los métodos convencionales, y de que es muy ventajoso cuando se le comparo con el sistema BACTEC 460TB, se debe determinar el rendimiento global cuando se utiliza en un ámbito clínico. La detección colorimétrica, no radiométrica, del

crecimiento micobacteriano, que elimina la necesidad del manejo y descarte del radioisótopo, es una ventaja clara. ¹

C. Sistema ESP Myco

1. FUNDAMENTO

Sistema con control continuo, totalmente automatizado. Se cultivan los microorganismos en caldo Middlebrook 7H9 modificado con enriquecimiento y una esponja de celulosa para incrementar la superficie de cultivo. El instrumento detecta el crecimiento por medio del control de la variación de presión, consecuencia del consumo de O₂ o por la producción de gas por los microorganismos que crecen. ^{3,4}

2. DESCRIPCIÓN

El ESP MYCO Cultura System es una adaptación del ESP Blood Culture System. Cada botella de cultivo, cuando se coloca en una gaveta especial en el módulo de la estufa, es unida a un sensor, que consiste en una caja plástica, una aguja suspendida y una membrana hidrofóbica. Así cada botella es continuamente monitoreada para evaluar cualquier cambio en la presión de gas debido a la actividad metabólica de los microorganismos en la botella de cultivo. Los cambios de presión significativos pueden ser identificados tempranamente a partir del consumo de oxígeno, o, más tarde, con la producción de gases del metabolismo de los microorganismos.

Cada botella contiene medio modificado de Middlebrook 7H9, Casitone, glicerol y esponjas de celulosa. Las esponjas proporcionan una plataforma de crecimiento para las micobacterias, ya que simulan los alvéolos de los pulmones. Inmediatamente antes de la inoculación de la muestra, cada botella es suplementada con una mezcla antibiótica (PVNA) que contiene polimixina B, anfotericina B, vancomicina, ácido nalidíxico.

Los ensayos de campo patrocinados por los fabricantes indican que el porcentaje total de cultivos positivos detectados por el ESP MYCO System se comparo favorablemente con el sistema BACTEC 460. Se debe descartar que las muestras provenientes de pacientes que recibieron tratamiento antituberculoso a veces no eran positivas en ninguno de los sistemas que utilizan medios líquidos, lo que indica la necesidad de inocular medios de cultivo sólidos en paralelo con las botellas del caldo. Los resultados de estos estudios indican además que el sistema ESP MYCO detectó cultivos positivos con anterioridad con una frecuencia tres veces mayor que el sistema BACTEC 460 y más de 7 días antes de alrededor de la mitad de los cultivos, basado probablemente en la señal temprana derivada durante la fase del consumo de oxígeno en el ciclo de crecimiento. Aunque los resultados de este ensayo de campo son impresionantes, el rendimiento global en el ámbito clínico aún so se ha determinado. El método de detección no radiométrico utilizado también excluye la necesidad de manipular y descartar materiales radiactivos. ¹

D. Sistema SEPTI-CHECK AFB

1. FUNDAMENTO

Sistema de cultivo bifásico compuesto por un caldo Middlebrook 7H9 modificado con una paleta de tres caras que contiene agares sólidos chocolate, a base de huevo y 7H11 modificado. Se invierte la botella a intervalos regulares para inocular el medio sólido. Se detecta el crecimiento mediante la observación de la paleta de tres caras.^{3,4}

2. DESCRIPCIÓN

Este sistema constituye en una botella tapada que contiene 20mL de caldo Middlebrook modificado bajo CO₂ al 20%. Una segunda componente en un tubo plástico, tapado en un extremo con una tapa a rosca removible, dentro del cual está incluida una paleta de dos caras, en cuyas dos superficies está embebido el medio sólido. Una superficie de la paleta está cubierta con agar Middlebrook 7H11 no selectivo; el lado opuesto está dividido en dos secciones, uno contiene medio LJ modificado y la otra agar chocolate para detectar el crecimiento de bacterias contaminantes.

El sistema se procesa mediante extracción de la tapa de la botella que contiene el medio de cultivo, al cual se le agrega 1mL de un suplemento reconstituido, también provisto por el fabricante, compuesto de glucosa glicerina, ácido oleico, piridoxina, HCl, catalasa, albúmina, azlocilina, ácido nalidíxico, trimetoprima, polimixina B y anfotericina B. El caldo suplementado se inocula luego con 0.5mL de una muestra tratada con NALC-NaOH. Se retira la tapa rosca de la parte superior de la paleta y se asegura el conjunto a la botella de caldo de cultivo. Los medios de cultivo sólidos sobre la paleta son inoculados invirtiendo el conjunto, para permitir que la mezcla del caldo del cultivo bañe toda la superficie del agar. El sistema es colocado luego en una estufa a 35°C en posición vertical. Las superficies del agar y los medios de cultivo se examinan cada tres días para ver la aparición del desarrollo, después de lo cual, si es negativo, el conjunto se invierte de nuevo para reinocular el medio con agar. Si se observa crecimiento, deben realizarse frotis para ácidosresistentes a partir de las colonias aisladas que desarrollan sobre la superficie del agar.^{1,4}



Figura 6.2 Frascos para hemocultivo bifásico Becton Dickinson SEPTI-CHECK AFB. La botella de abajo que contiene el medio de cultivo, se siembra con sangre y el componente superior, que contiene tiras de agar, se agrega en el laboratorio. Para sembrar el agar se invierte el frasco para permitir que el medio con sangre fluya por encima del agar.¹

E. Tubo indicador de crecimiento de bacterias

1. FUNDAMENTO

El tubo de cultivo contiene caldo Middlebrook 7H9 y un material fluorescente inmerso en un sensor de silicona. Se detecta el crecimiento visualmente con luz ultravioleta. El oxígeno (O₂) disminuye la emisión fluorescente del sensor; en consecuencia, se detecta el consumo de O₂ por los microorganismos presentes en el medio como aumento de la fluorescencia.^{2,3}

2. DESCRIPCIÓN

El sistema Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) consiste en un tubo de vidrio con fondo redondo de 16x100 mm que contiene 4mL de base de caldo 7H11 modificado, al cual se le ha agregado 0.5mL de OADC como enriquecimiento (ácido oleico, albúmina, bovina, dextrosa y catalasa) y 0.1mL de la mezcla antibiótica PANTA (polimixina B, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprima, azlocilina). La mezcla antibiótica obviamente inhibe el desarrollo de bacterias contaminantes; el suplemento OADC proporciona ácido oleico, un importante estimulante metabólico para las micobacterias; albúmina, para unirse a los ácidos grasos libres tóxicos, dextrosa como fuente de energía; y catalasa para destruir los peróxidos tóxicos que pueden estar presentes en el medio. Un compuesto fluorescente es embebido en siliconas en el fondo del tubo. Este compuesto es sensible al oxígeno disuelto en el medio; es decir, la presencia de oxígeno en el medio no inoculado sirve para extinguir la emisión de la luz fluorescente. Como el crecimiento bacteriano activo consume el oxígeno disuelto, la fluorescencia es desenmascarada y puede ser detectada observando el tubo bajo una luz de longitud de onda ultravioleta (lámpara de Wood). También se puede observar el crecimiento observando una turbidez no homogénea o pequeños gránulos o copos en el medio de cultivo.

Para realizar la prueba, los 0.1mL de PANTA y los 0.5mL de la mezcla OADC se agregan asépticamente al tubo, y se reconstituye el medio liofilizado. Esto es seguido por 0.5mL de muestra o un concentrado de ella; si se agrega más de 0.5mL de muestra puede afectar adversamente el rendimiento del tubo. Se coloca la tapa, se mezclan los ingredientes por inversión del tubo varias veces y se coloca el tubo en una estufa a 37°C. Los tubos se leen día por medio, a partir del día 2, con lámpara de Wood, colocando el tubo con la mezcla que se va a probar entre un control positivo (solución de sulfito de sodio) y uno negativo (tubo MGIT sin inocular). Se deben utilizar anteojos protectores de luz UV para observar el color naranja brillante en el fondo de los tubos positivos, con una reflexión naranja observada también en el menisco. Los tubos positivos se tiñen con para ácidos resistentes, de preferencia con la técnica Ziehl-Neelsen. Los tubos negativos se colocan nuevamente en la estufa y se observan a intervalos regulares hasta las seis semanas.

Todas las reacciones positivas deben ser confirmadas por una coloración para ácidosresistentes debido a que en ocasiones pueden desarrollar otras bacterias que consumen oxígeno a pesar de la mezcla antibiótica PANTA.

Una desventaja importante es el alto costo de cada tubo (unos 8 dólares por unidad); sin embargo, esto es compensado en algún grado, ya que la fluorescencia se observa visualmente y no requiere equipos elaborados o costosos).¹

F. Sistema BD BACTEC™ MGIT™ 960

El sistema de BACTEC MGIT 960 es no radiométrico. El sistema utiliza caldo de Middlebrook 7H9 (7mL en tubo de plástico) y detecta el crecimiento a través del control del consumo de oxígeno mediante un sensor de fluorescencia.^{1, 2,4}

Se ha utilizado para pruebas de sensibilidad in vitro para M. tuberculosis.

BD BACTEC MGIT 960 sistema innovador, ahora caracterizando por los tubos plásticos para las seguridad y comprobación de susceptibilidad de antimicrobiana mejorada. El BACTEC MGIT 960 ofrece mayor capacidad, operación segura, resultados rápidos y el rendimiento más alto de cualquier sistema automatizado.

Los tubos plásticos mejoran seguridad: El sistema de BD BACTEC MGIT 960 acentúa seguridad de operador con los tubos plásticos, no es necesario manejarse agujas ni transferir tubos una vez que el sistema es cargado.

Comprobación enteramente automatizada: Identifica grado positivo como sucede a menudo a un índice rápido que por otro instrumento. Los resultados rápidos pueden mejorar cuidado paciente y la salud, son inferiores los costos por reducirse las permanencias en el hospital.

El sistema de BACTEC MGIT 960 tiene una capacidad de espacio económico de 960 tubos que le deja procesar hasta 8,000 especímenes por año. La supervisión continua identifica grado positivo como ellos ocurren. Almacenamiento de datos a largo plazo

El sistema de BD BACTEC MGIT 960 combina calidad y fiabilidad con la tecnología usada en el sistema MGIT (tubo indicador de crecimiento de Mycobacteria).

BD BACTEC MGIT 960 un nuevo nivel de simplicidad y ejecución, es diseñado con la simplicidad en mente, asegurando la productividad máxima con menos personal y entrenamiento.

El tubo inoculado se entra entonces en el instrumento por la vía de la exploración de código de barras que guía el circuito de producción de 4 pasos simple. El instrumento de BACTEC MGIT 960 de forma automática dirige la colocación de cada tubo dentro del instrumento donde incubación continua y la supervisión ocurren hasta el sistema indica un grado positivo o un negativo completado del espécimen.²



Fig. 6.3 Paso 1: Circuito de producción selecto



Fig. 6.4 Paso 2: Examine el tubo del instrumento.



Fig. 6.5 Paso 3: Cargue donde indica la luz verde. ²

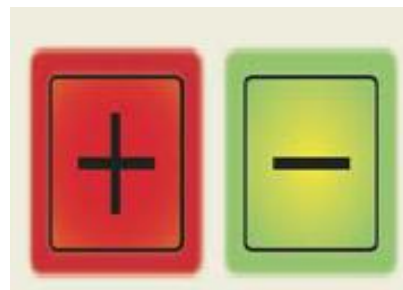


Fig. 6.6 Paso 4: Quite los grados positivos y complete el negativo como ocurren.



Fig. 6.7 SISTEMA BD BACTEC™ MGIT™ 960. ²



Fig. 6.8 SISTEMA BD BACTEC™ MGIT™ 960. ²

G. Sistema BACTEC 9000 MB (BECTON DKINSON)

1. FUNDAMENTO

Se cultivan los microorganismos en un caldo Middlebrook 7H9 modificado. El instrumento detecta el crecimiento a través del control del consumo de O₂ mediante un sensor de fluorescencia.³

2. DESCRIPCIÓN

El sistema BACTEC 9000 es continuamente monitoreado, automatizado no radiométrico, emplea un medio de cultivo *BACTEC Myco/F Lytic* que es una formulación de Middlebrook 7H9 y caldo de infusión de cerebro y corazón que se utiliza para la recuperación de micobacterias en muestras de sangre y de levaduras y hongos en sangre y fluidos corporales estériles. Se han hecho modificaciones específicas para mejorar el crecimiento y recuperación de micobacterias, levaduras y hongos. Estas modificaciones incluyen la adición de citrato férrico amónico como una fuente de hierro para cepas específicas de micobacterias y hongos, la adición de saponina como un agente hematólítico y la adición de proteínas y azúcares específicos para aportar suplementos nutritivos. Cada frasco contiene un indicador que puede detectar descensos en la concentración de oxígeno en el frasco como resultado del metabolismo y crecimiento de microorganismos. El indicador está controlado por los sistemas *BACTEC 9000* para el cultivo de sangre, los cuales detectan el aumento de la fluorescencia, que es proporcional al descenso de oxígeno.

Un resultado positivo indica la presencia presunta de microorganismos viables dentro del frasco.

Las muestras se inoculan en el frasco *BACTEC Myco/F Lytic* utilizando una jeringa o por toma directa con una aguja y tubo. El frasco es introducido en el sistema *BACTEC 9000* para el cultivo de sangre e incubado a 35° C con agitación continua para obtener una recuperación máxima. El protocolo de análisis predeterminado dura 42 días. Los protocolos de análisis recomendados para los siguientes organismos duran 7 días para las levaduras, 30 días para los hongos y 42 días para las micobacterias. La detección se limita a los microorganismos capaces de crecer en el medio de cultivo a 35° C. El medio de cultivo no es selectivo y permite el crecimiento de otros organismos aerobios, incluyendo bacterias cuya presencia puede interferir en la recuperación de micobacterias, levaduras y hongos de crecimiento más lento. Los frascos de cultivo que permanecen negativos después de completar el protocolo y que no muestran indicios visibles de ser positivos se retiran del instrumento y se esterilizan antes de desecharse.⁵

RESUMEN

Las micobacterias son bacterias patógenas con alta virulencia por lo consiguiente son de gran interés en el área de la salud.

Los sistemas automatizados de identificación se clasifican según el método de detección: radiométricos y no radiométricos.

El sistema radiométrico (*BACTEC*) detecta producción de CO₂ radioactivo.

Los principios básicos de los sistemas no radiométricos son a través de la detección de O₂ mediante un sensor de fluorescencia, cambios de color de una membrana indicadora (*MB-BacT*), cambios de presión de los gases contenidos en los frascos (*ESP*) o emisión de fluorescencia.

El antibiograma se realiza únicamente a pacientes que han recibido tratamiento y se sospecha una resistencia adquirida a determinados fármacos debido a que es muy laborioso y costoso. El sistema Bactec se adaptó para realizar el antibiograma pero se necesita autorización para utilizar este sistema debido a que es radiométrico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Koneman, Elmer W.K, Diagnóstico Microbiológico. Edición Quinta. España: Editorial Panamericana.1999.
2. BD Becton Dickinson.[sede Web]. USA: Becton, Dickinson and Company; 2007 [Fecha de acceso 10 Diciembre 2007] Mycobacteria testing. [6 pg.]. <http://www.bd.com/ds/productCenter/MT-Bactec.asp>
3. Forbes A Betty, Sahm Daniel F, Weissfeld Alice S. Diagnóstico Microbiológico. 11ª ed. Madrid España: Médica Panamericana; 2004.
4. Truant L Allan. Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology. United States of America: Washington, D.C; 2002.
5. Finegold Sydney M, Baron Ellen J. Diagnóstico Microbiológico. 7ª ed. Buenos Aires Argentina: Médica Panamericana; 1996.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La elaboración de este manual servirá como material didáctico en apoyo a los alumnos de la asignatura de biología médica de la carrera de Q.F.B y personal del área de la salud y a fines.

Los sistemas automatizados son uno de los avances importantes en el campo de la medicina, gracias a ello se desarrolla un mejor diagnóstico microbiológico por lo que en la actualidad es indispensable conocer el fundamento y estructura de estos sistemas.

Anteriormente las pruebas bioquímicas se realizaban manualmente, en la actualidad se encuentran en pocillos de placas y la identificación del microorganismo es llevada con mayor rapidez, los resultados y la lectura de estas placas se obtienen por computadora, la cual utiliza el sistema binario.

Este aporte facilita la labor del químico en la clínica disminuyendo la carga de trabajo y el índice de error ya que 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 Químico clínico pueda detectar turbidez.

Los sistemas automatizados de identificación y susceptibilidad de microorganismos, por diferentes métodos (colorimetría, turbidimetría, fluorimetría, etc.) detectan el desarrollo bacteriano en micropaneles que contienen diluciones seriadas del antimicrobiano, estableciendo la mínima concentración que es capaz de inhibir el desarrollo bacteriano. Por lo que es importante conocer los sistemas y aparatos que se manejan actualmente, para un mejor desarrollo laboral.

Los sistemas comerciales con frecuencia se clasifican en automatizados o no automatizados. Se le llama a un sistema o equipo automatizado aquel que parcialmente o en su totalidad identifica el microorganismo en forma computarizada. Pueden automatizarse muchos aspectos de un sistema esto implica, los pasos de inoculación, la incubación y la lectura de las pruebas, así como el análisis de los resultados. Sin embargo, no hay criterios estrictos que establezcan cuántas partes de un sistema completo deben automatizarse para que se clasifique como automatizado.

La automatización permite llevar a cabo la identificación y determinaciones de la susceptibilidad del microorganismo que causan enfermedades infecciosas en el hombre, de una manera rápida y eficaz. Se dice que las pruebas son rápidas cuando se determinan el mismo día de la inoculación del microorganismo o entre las cuatro horas después de la inoculación, es eficaz cuando se realizaron previas pruebas que indican que el porcentaje de error es mínimo, utilizando controles positivos y negativos que verifican la certeza de los resultados.

El utilizar equipos automatizados en el laboratorio de microbiología tiene sus ventajas y desventajas, por lo tanto el laboratorio debe elegir qué equipo le conviene, dependerá del número de muestras que tenga para analizar, del personal con que cuente el laboratorio y el costo de este, además de las características a definir del microorganismo, ya sea solo por la identificación o también por las pruebas de sensibilidad de este hacia los antimicrobianos.

En la identificación del microorganismo se producen reacciones que incluyen reacciones de pH-base, reacciones de enzimas-base, utilización de fuente de carbono, detección visual de desarrollo de bacterias.

Aunque el sistema se ha en su totalidad automatizado es de gran importancia que el personal del laboratorio microbiológico tenga los principios básicos de la identificación microbiológica que se antepone para cualquier diagnóstico, por ejemplo, en el laboratorio se tiene baterías para determinar la sensibilidad a agentes antimicrobianos y/o la identificación de microorganismos gramnegativos y grampositivos, el químico clínico antes de inocular las muestras problema debe aislar e identificar si el microorganismo es gram negativo o positivo, por lo tanto, el químico clínico debe tener conocimiento y preparación necesaria para el manejo y buen aprovechamiento de estos equipos y necesita tener una buena fuente de información referente al tema para tener un mejor desarrollo y desempeño laboral.

Una correcta y rápida identificación permite que el paciente lleve un tratamiento adecuado para su pronta recuperación.

CONCLUSIÓN

Con la investigación documentada de diferentes fuentes como libros, artículos de revistas y búsqueda electrónica, se elaboró un manual referido a la automatización en el área de microbiología y este incluye los datos más relevantes y actualizados de sistemas automatizados y semiautomatizados utilizados en el laboratorio de microbiología, que apoyará al módulo de biología médica del noveno semestre de la carrera de QFB, personal del área de la salud y afines.