



**APUNTE DE APOYO
PARA TRABAJOS PRACTICOS DE MICROBIOLOGIA**



**Verónica Madrid Valdebenito
Prof. Asistente
Depto. Microbiología –
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción, Chile**

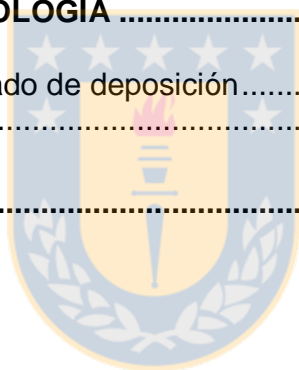
2013



© **Verónica Madrid Valdebenito**
Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción (Chile)
2013

ÍNDICE

ANEXOS UNIDAD MICROBIOLOGÍA.....	3
Normas de seguridad	3
Materiales y equipos de uso habitual.....	4
Medios de cultivo	6
Técnicas de siembra.....	9
Identificación de bacterias	10
Métodos para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana	13
Efecto de agentes físicos, químicos y mecánicos sobre bacterias	17
Microbiota normal	21
Microbiología de las IAAS.....	24
Esquemas para la identificación de bacterias.....	31
ANEXOS UNIDAD PARASITOLOGIA	33
Examen parasitologico seriado de deposición.....	33
Test de Graham	34
BIBLIOGRAFÍA	35



Anexos Unidad de Microbiología

I.- Normas de seguridad

- 1.- Usar delantal blanco destinado exclusivamente para el Laboratorio de Microbiología.
- 2.- Está prohibido comer, beber o llevar cualquier tipo de objeto a la boca
- 3.- Se debe trabajar con calma y cuidado para minimizar la creación de salpicaduras y aerosoles, pues pueden ser infecciosos para el operador.
- 4.- Se deben evitar los desplazamientos innecesarios por el Laboratorio. Las muestras deben manipularse a 30 cm de la llama del mechero.
- 5.- Las asas se esterilizarán en el mechero de Bunsen antes y después de su uso. Se debe esperar unos segundos para que se enfríen después de flamearlas. Se deben dejar en un soporte **NO SOBRE EL MESON**.
- 6.- Las placas de Petri deben ser abiertas solamente en el momento de la siembra y a una distancia no superior a 30 cm del mechero
- 7.- Los tubos deben ser flameados en el mechero antes y después de abrirlos
- 8.- No está permitido pipetear con la boca. **USE PROPIPETAS**
- 9.- Cuando se manipulen microorganismos evite hablar innecesariamente o llevarse las manos a la nariz, boca, ojos etc.
- 10.- Para eliminar el material de desecho contaminado, (pipetas Pasteur, portaobjetos, etc) usted encontrará receptáculos rotulados.
- 11.- El lavado de manos debe efectuarse siempre después de la manipulación de muestras y antes de abandonar el laboratorio.
- 12.- Los alumnos que tengan el pelo largo deben mantenerlo recogido para evitar accidentes, sobre todo al trabajar con mecheros.
- 13.- Frente a derrame o cualquier tipo de accidente, avise al personal encargado
- 14.- Cuide el microscopio. Enciéndalo sólo en el momento de la observación. Limpie los objetivos una vez terminado el trabajo.
- 15.- Los alumnos deben abstenerse de colocar en las mesas de trabajo cualquier material que no sea el requerido para la realización de la práctica (por ejemplo: ropa, bolsas de mano, libros, etc).
- 16.- Los alumnos deben presentarse al laboratorio adecuadamente preparados, habiendo consultado previamente en su manual la práctica correspondiente. Debe leer con detenimiento la técnica a seguir, en caso de existir dudas consultar al profesor **ANTES** de iniciar la práctica.

II.- Materiales y equipos de uso habitual

Mechero de Bunsen

Este sirve para esterilizar la boca de tubos de ensayo, pipetas, portaobjetos, etc. (flameando suavemente), asas (calentando al rojo).

Placas de Petri

Recipientes de vidrio en los cuales se coloca una determinada cantidad de medio de cultivo sólido (con agar-agar) hasta completar una altura aproximada de 4 mm. Consta de una base y una tapa. Debe mantenerse cerrada, excepto en los breves momentos en que debe sembrarse el medio de cultivo.

Pipetas Pasteur

Están formadas por un tubo angosto (5-6 mm) de vidrio esterilizado y estirado hasta sellar la punta. Sirve para trasladar material líquido (gotas), o bien para diseminar siembras (acodando el extremo, o formando un “rastrillo” con éste). Se debe romper la punta y luego flamearla, antes de ser utilizada.

Pipetas graduadas

Son las pipetas corrientes utilizadas en química que se envuelven en papel y se esterilizan en el horno Pasteur. Al desenvolverse, deben flamearse al mechero antes de su uso.

Tubos de ensayo

Se encuentran taponados con algodón no hidrófilo o con tapas especiales (metálicas o de plástico). Debe flamearse la boca del tubo después de sacar la tapa y antes de volverla a poner en posición.

Matraces

Son los matraces habituales que se encuentran taponados con algodón no hidrófilo y esterilizados en el Horno Pasteur. Se debe flamear la boca del matraz después de sacar la tapa y antes de volverla a poner en posición.

Asas

Instrumentos que tienen alambre (nicrom) en la punta, en forma de aguja (asa recta) o con un pequeño círculo en el extremo (asa circular). Sirven para efectuar siembras bacterianas desde muestras sólidas o líquidas.

Microscopio

En bacteriología se emplea el objetivo 40x para observaciones sin tinción (a fresco) y el objetivo 100x para observaciones por inmersión (colocando una gota de aceite de cedro sobre la preparación teñida).

El microscopio debe quedar perfectamente limpio después de finalizada la observación correspondiente. Para ello utilice un paño impregnado con alcohol.

Estufa de cultivo

Las siembras efectuadas con bacterias o productos biológicos en medios de cultivo deben cultivarse en estufas que se encuentran a la temperatura apropiada (ej. 25, 35, 37°C). Esta temperatura depende del tipo de microorganismo investigado.

Baño María

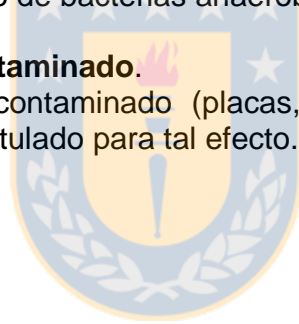
Consiste en un receptáculo con agua de la llave y que tiene una fuente de calor para mantener una determinada temperatura. Generalmente se hace hervir el agua, por ejemplo, para fundir el agar en los tubos con medios de cultivo sólido.

Sistema para cultivo en anaerobiosis

Jarra de plástico transparente con tapa hermética. Dentro de la jarra se colocan las placas sembradas, un sobre que contenga mezcla de reactivos que fijan el oxígeno presente en la jarra en forma permanente, es decir, generan una atmósfera carente de oxígeno (por ejemplo Anaerocult^{RA}) y una tira indicadora de anaerobiosis, es decir un material impregnado con una solución química que cambiará de color al momento que se alcance las condiciones de oxido-reducción adecuadas para el crecimiento de bacterias anaerobias dentro de la jarra.

Eliminación de material contaminado.

El material usado y contaminado (placas, tubos, matraces, etc.) debe colocarse en el receptáculo rotulado para tal efecto.



III.- MEDIOS DE CULTIVO

Mezcla de elementos nutrientes que se usan para permitir el crecimiento de los microorganismos. Se clasifican en base a los siguientes criterios:

a) Estado físico:

Sólidos: contiene agar y se puede observar el crecimiento de **colonias**

Líquidos: no contienen agar, el crecimiento se evidencia por **turbidez**

Semisólidos: contienen agar diluido, el crecimiento se evidencia por turbidez

b) Presentación:

En placas

En tubos

c) Contenido de nutrientes:

Medios de enriquecimiento: son aquellos que contienen nutrientes específicos para favorecer el desarrollo de un microorganismo en particular. Se usan cuando se sospecha que el microorganismo buscado está en baja cantidad o mezclado con otras especies.

Medios de apoyo: contienen nutrientes que permiten el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, (siempre que no tengan exigencias especiales). Ej: agar tripticasa.

Medios selectivos: permiten el crecimiento de los microorganismos buscados porque contienen compuestos que inhiben el crecimiento de los demás. Por ejemplo la adición de cristal violeta impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas

Medios diferenciales: contienen componentes que ponen en evidencia características metabólicas del microorganismo que se está cultivando, permitiendo así diferenciarlo. Por ejemplo medios adicionados de sangre para evidenciar la producción de hemolisinas, o adicionados de azúcares.

Medios selectivos /diferenciales: mezcla de los dos anteriores. Estos medios contienen un compuesto que inhibe el crecimiento de un determinado grupo de microorganismos y además un componente que pondrá en evidencia alguna característica metabólica. Ej. Agar Mac Conkey favorece el crecimiento de bacterias Gram negativas y además diferencia entre aquellas Gram negativas que fermentan lactosa, (cuyas colonias se observarán fucsia) y las que no lo hacen (colonias blancas), porque contiene lactosa y un indicador de pH.

Medios especiales: son medios que contienen compuestos y nutrientes especiales para cubrir las necesidades de cultivo de bacterias bien determinadas. Estos medios facilitan el aislamiento de dichas bacterias

- Para el aislamiento de *Staphylococcus*: Medio agar manitol - cloruro de sodio (Chapman).
- Para el aislamiento de *Bordetella pertussis*: Medio de Bordet-Gengou.
- Para el aislamiento de *Mycobacterias*; medio de Lowenstein-Jensen.
- **Medio para bacterias anaeróbicas:** en general se pueden usar los medios para microorganismos aeróbicos, pero adicionándolos con algún compuesto químico reductor para mantener el ambiente de anaerobiosis, como por ejemplo el tioglicolato de sodio.

Entre los medios diferenciales de uso más corriente se encuentran:

Agar-fierro-triple-azúcar: (Agar TSI). Se siembra en picada y superficie. Indica fermentación de glucosa (en profundidad) y utilización de lactosa y sacarosa (en superficie) con formación de ácido y gas (ruptura del agar). Además detecta la producción de H₂S (coloración negra del medio). Agar inclinado, sólido de color rojo.

Indicador de pH: rojo fenol

Interpretación:

Anotación: agar tendido/columna, gas, H₂S

A=acidez (color amarillo)

K= alcalinidad (color rojo)

Prueba LIA (Agar Lisina Hierro). Se siembra en picada y superficie. Indica decarboxilación de lisina (todo el tubo azul) o deaminación de la lisina (tendido rojo). Además es más sensible para la detección de H₂S que el TSI. Agar inclinado, sólido de color violeta.

Indicador de pH: púrpura de bromocresol

Interpretación:

Anotación: agar tendido/columna, gas, H₂S

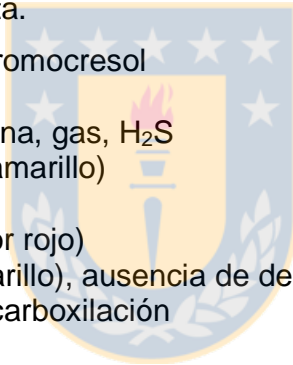
Tendido: A=acidez (color amarillo)

K= alcalinidad (color azul)

R= deaminación de lisina (color rojo)

Columna: A=acidez (color amarillo), ausencia de decarboxilación

K= alcalinidad (color azul), decarboxilación



Prueba MIO (Motilidad-Indol-Ornitina). Se inocula en el centro de la columna hasta el fondo. Se emplea para detectar motilidad, liberación de Indol y decarboxilación de la ornitina. Agar plano, semisólido de color púrpura.

Indicador de pH: púrpura de bromocresol

Interpretación:

Movilidad (+) enturbiamiento del medio

(-) enturbiamiento del medio sólo en la picada de siembra

Indol (+) formación de anillo rojo al agregar reactivo Kovacs

(-) al agregar reactivo Kovacs, éste permanece amarillo

Ornitina (+) alcalinidad (color azul), hay decarboxilación

(-) acidez (color amarillo), ausencia de decarboxilación

Medio agar-citrato de sodio (Medio de Simmons): Se siembra en superficie. Para el estudio de la utilización del citrato de sodio, como única fuente de carbono. Agar inclinado, sólido de color verde.

Indicador de pH: azul de bromotimol

Interpretación: (+) se torna azul oscuro

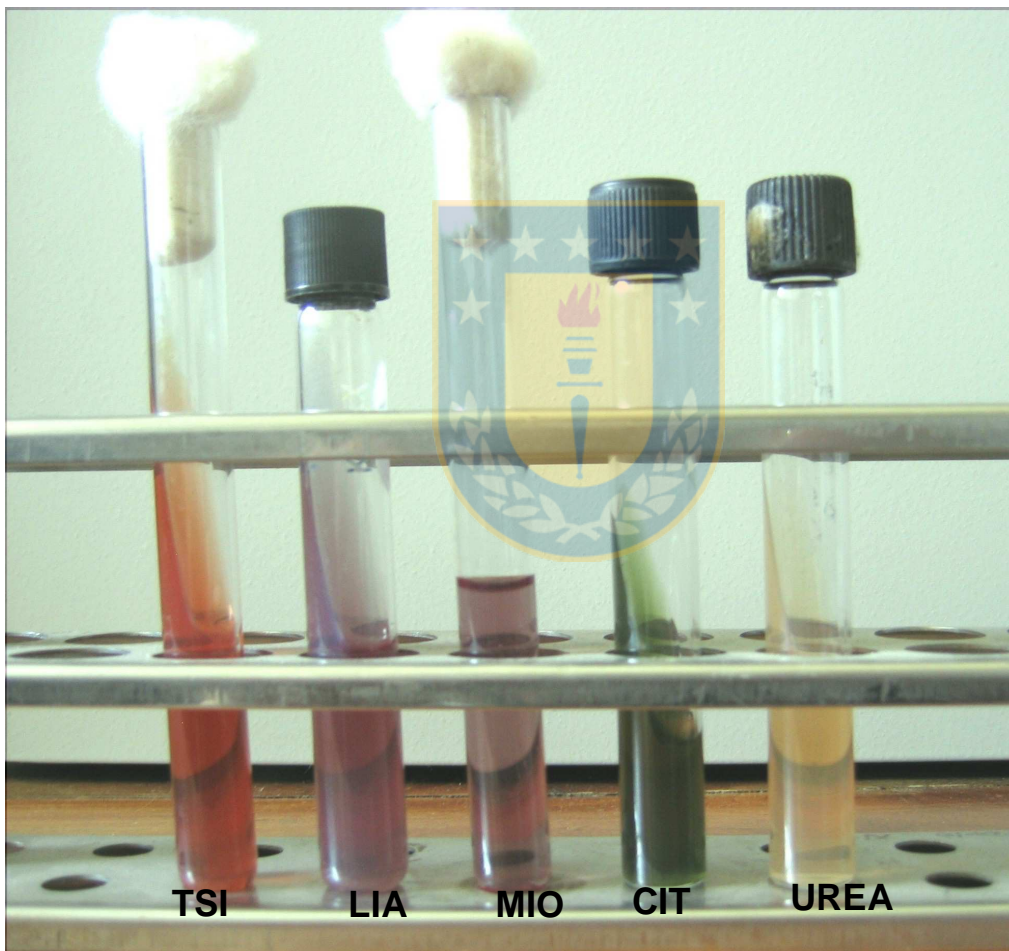
(-) se mantiene el color verde

Medio agar-Urea (Medio de Christensen). Se siembra en superficie. Se usa para la detección de hidrólisis de urea. Agar inclinado, sólido de color amarillo.

Indicador de pH: rojo fenol

Interpretación: (+) se torna rosado

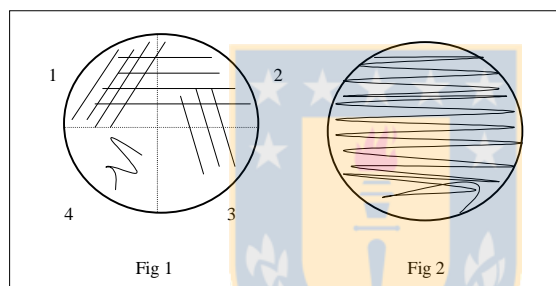
(-) se mantiene amarillo



Batería Bioquímica básica para la identificación de Enterobacterias

IV.- TÉCNICAS DE SIEMBRA

Siembra en placa por diseminación (agotamiento): se usa para obtener colonias aisladas. Se puede diseminar por cuadrantes: En el primer cuadrante se siembra la muestra clínica directamente, con la tórula; luego con un asa se disemina desde el primero hacia el segundo cuadrante. Se esteriliza el asa. Se procede a diseminar desde el segundo hacia el tercer cuadrante. Se esteriliza el asa. Por último en el cuarto cuadrante se disemina en estría (Fig 1). También se puede diseminar en superficie colocándolo el inóculo en el borde de la placa y procediendo a recorrer el agar describiendo un zigzag lo más amplio y numeroso posible con el fin de agotar las bacterias presentes en el asa y así obtener colonias separadas (Fig 2)



Siembra homogénea en superficie: se coloca un inóculo líquido sobre la superficie del agar y luego se procede a diseminarlo por toda la superficie con ayuda de un asa de Drigalski previamente esterilizada.

Siembra por inclusión: se vierte un volumen del inóculo líquido en una placa de Petri y luego se agrega el agar a 45° -50°C (en estado líquido), se mezcla con movimientos circulares y se deja enfriar.

Siembra cuantitativa: el objetivo es cuantificar el número de bacterias presentes. Para ello se puede usar la técnica de siembra homogénea en superficie o siembra por inclusión, lo importante es que se debe sembrar una cantidad conocida de la muestra.

V.- Identificación de bacterias

Los métodos microbiológicos tradicionales, se basan en:

Obtención de un cultivo puro, es decir, observación y estudio de una colonia bacteriana aislada, que ha crecido en un medio sólido.

- a) Observación del aspecto macroscópico de la colonia (tamaño, pigmentación, forma, producción de cambios en el agar como resultado de su crecimiento, olor, apariencia de la superficie, apariencia de los bordes).
- b) Observación microscópica de las bacterias presentes en dicha colonia, mediante tinciones diferenciales como es la Tinción de Gram.
- c) Observación del comportamiento de las bacterias sometidas a diferentes pruebas bioquímicas y serológicas que nos permitan identificar el género y la especie

Confección del frotis:

1a.- A partir de un medio sólido: Coloque una gota de agua o solución fisiológica sobre un portaobjetos. Con ayuda del asa recta toque una de las colonias (cuyas características hayan sido descritas) y emulsione con la gota de agua. Extienda aproximadamente 1 cm²

1b.- A partir de un medio líquido: Coloque una gota del cultivo en caldo. Extienda aproximadamente 1 cm². Agite el tubo antes de sacar su muestra

2.- Deje secar al ambiente y fije con calor

Tinciones:

Se denominan **tinciones simples** aquellas que usan un solo colorante, ejemplo: azul de metileno, permitiendo observar forma u agrupación. Las **tinciones diferenciales** en cambio, usan varios colorantes en forma secuencial y permiten una primera clasificación en base al comportamiento de la bacteria frente a esa tinción.

1.- Tinción de Gram, (tinción diferencial):

- Colocar el portaobjetos sobre un soporte y cubrir el extendido con cristal violeta. Dejar
- 1 minuto. Lavar
- Cubrir con lugol (forma un complejo con el cristal violeta). Dejar 1 minuto Lavar
- Decolorar con alcohol acetona durante 30 segundos. Lavar
- Cubrir con el colorante de contraste (fucsina o safranina). Dejar 30 segundos. Lavar
- Secar con papel absorbente. Enfoque su preparación con aumento 10x, coloque una gota de aceite de inmersión y cambie a objetivo 100x, ajuste el enfoque y observe.

La tinción de Gram es muy importante, pues es la base para clasificar las bacterias. Con esta tinción se diferencian:

- a) Bacterias Gram positivas, que retiene el primer colorante usado que es el cristal violeta y aparecen azules. Esto se debe a que su gruesa capa de peptidoglicán no permite la salida del cristal violeta.
- b) Bacterias Gram negativas que no retienen el cristal violeta, porque el alcohol acetona forma poros en su pared que tiene alto contenido lipídico, de este modo, se tiñen con el segundo colorante que es la fucsina o safranina y por lo tanto se ven de color rosado.
- c) La tinción de Gram permite además apreciar la forma y agrupación de las bacterias.

2.- Tinción de Ziehl-Neelsen, **(tinción diferencial)**:

- Cubrir el frotis con fucsina fenicada de Ziehl Aplicar calor bajo el portaobjetos hasta la emisión de vapores dejar teñir durante 5 minutos.
- Decolorar con alcohol ácido alternando con lavados con agua de la llave
- Cubrir el frotis con azul de metileno durante 30 segundos, como tinción de contraste.
- Lavar con agua.
- Dejar secar a temperatura ambiente (no se aconseja hacerlo con papel filtro).
- Enfoque su preparación con aumento 10x, coloque una gota de aceite de inmersión y cambie a objetivo 100x, ajuste el enfoque y observe.

La tinción de Tinción de Ziehl-Neelsen., por tanto, también es una tinción diferencial, porque permite la observación de un grupo especial de bacterias, denominadas “bacterias alcohol-ácido resistentes”, pues no pierden la coloración inicial con la fucsina por acción del alcohol ácido y se observan de color rojo. El resto de la preparación se observa de color azul.

Por tanto, para encontrar el agente etiológico de una determinada enfermedad que afecta a un paciente o para conocer el estado sanitario de alguna muestra, es necesario aislar el agente y a veces, además de aislarlo se necesita cuantificar su presencia en la muestra. Cuando el aislamiento no es posible se recurre a indicadores indirectos de su presencia. Por ejemplo: *detección de componentes estructurales como: cápsula, fimbrias, flagelos, toxinas, glicoproteínas o productos del agente infecciosos como: enzimas, toxinas o metabolitos*). Por ejemplo: detección en alimentos de nucleasa termoestable (DNasa) de *Staphylococcus aureus*. Las técnicas más usadas son los inmunoensayos: ELISA, Inmunofluorescencia, aglutinación con látex

Los avances tecnológicos han permitido incorporar al laboratorio de rutina, las herramientas de la biología molecular, es así, como cada día se incrementa la disponibilidad de técnicas para detección de segmentos de ácidos nucleicos que son específicos de cada agente. Entre ellas podemos citar: Hibridización mediante sondas, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



VI.- Métodos para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana

Bases bioquímicas de la acción antimicrobiana:

Una vez que la célula bacteriana ha logrado entrar y adherirse a su tejido diana, inicia su crecimiento, es decir, se multiplica. Para ello requiere sintetizar macromoléculas y capturar elementos que le son esenciales. Los agentes antimicrobianos interfieren con procesos específicos que son esenciales para el crecimiento y/o división de la bacteria.

Principios y definiciones:

Es deseable que un agente antimicrobiano ideal sea selectivamente tóxico, es decir actúe sobre el patógeno más que sobre el hospedador. En base a su sitio de acción, los antimicrobianos se pueden agrupar en:

- Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana
- Inhibidores de la síntesis proteica
- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos
- Antimetabolitos

Actividad del antimicrobiano:

Bactericidas: compuestos que matan las bacterias. Ej. Penicilina

Bacteriostáticos compuestos que inhiben procesos metabólicos en forma reversible. Ej sulfonamidas, tetraciclina. De este modo cuando los niveles de estos compuestos se hacen subinhibitorios, el metabolismo de la bacteria puede reanudarse.

CMI, es la mínima concentración que inhibe el crecimiento de una bacteria. Corresponde a una medición *in vitro* de la actividad inhibitoria de un agente antimicrobiano.

CMB, es la mínima concentración de antibiótico capaz de matar a la bacteria

Las características farmacológicas del agente antimicrobiano son críticas para su elección, dosis, rutas y frecuencia de administración.

Existen tres orígenes de compuestos antibacterianos:

- Derivados de otros microorganismos Por ejemplo: del género *Penicillium*, *Streptomyces* (estreptomycina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina).
- Sintetizados químicamente. Por ejemplo: sulfonamidas, trimetoprim.
- Derivados de manipulación molecular de antibióticos. Por ejemplo: cefalosporinas, aminoglicosidos.

Espectro antibacteriano:

Es el rango de actividad de cada antimicrobiano

- Reducido espectro: son restringidos en su acción. Ej Penicilina es muy efectiva contra cocos Gram positivos y negativos, pero tiene poca actividad contra bacilos Gram negativos entéricos.

Amplio espectro: actúan contra múltiples microorganismos no relacionados. Ej. Cloranfenicol, Tetraciclina. Inhiben un amplio rango de bacterias Gram positivas y negativas.

La combinación de diferentes clases de antimicrobianos puede tener distintos efectos: sinergia, adición, antagonismo.

Métodos para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana

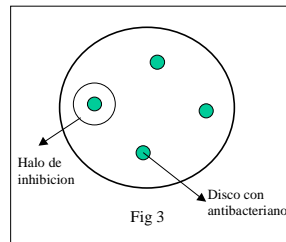
Para determinar cuál es el antimicrobiano adecuado para realizar o continuar un tratamiento, se hace necesario averiguar qué compuestos antimicrobianos son capaces de inhibir *in vitro*, el crecimiento de la cepa en estudio.

1.- Antibiograma: método de estudio de susceptibilidad por difusión (Kirby-Bauer, Fig. 3), es un método estandarizado (el inóculo, cantidad de agar Muller Hinton, la concentración de antimicrobiano en los discos y la forma de sembrar la placa). De este modo los resultados son reproducibles.

- A partir de un cultivo puro, preparar un inóculo suspendiendo 2 a 3 colonias en caldo Muller-Hinton
- Ajustar la densidad del inóculo a Mac Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml)
- Con una tórula, sembrar en cuadrantes la placa con agar Muller Hinton,, rotándola en 60° cada vez, cuidando de formar un tapiz homogéneo
- Con ayuda de una pinza, colocar en forma ordenada, discos impregnados de antibiótico, presionar suavemente sobre el agar (ver Fig. 3). Los discos a usar son seleccionados dependiendo de la cepa en estudio.
- Incubar a 37° C durante 18 a 24 horas.

Lectura e interpretación del antibiograma

- Con una regla, se mide (en mm), los halos de inhibición alrededor de cada sensidisco.
- El CLS (Clinical and Laboratories Standards), publica tablas donde aparecen los diámetros de los halos, los que han sido obtenidos correlacionándolos con las CMI. Los resultados se catalogan como: susceptible, intermedio y resistente.



SUSCEPTIBLE (S): significa que la infección causada por ese microorganismo puede ser apropiadamente tratada con dosis habituales del antibiótico estudiado

INTERMEDIO (I): esta categoría incluye organismos que son inhibidos por concentraciones del antibiótico que están cercanas a las alcanzadas por ese antibiótico en el plasma y por lo tanto pueden responder pobremente a la terapia

RESISTENTE (R): significa que el microorganismo no sería inhibido por el antibiótico en dosis habituales o que tiene mecanismos de resistencia contra el.

Existen otros métodos en que la bacteria en estudio es sembrada en:

- a) Series de placas de agar que contienen concentraciones crecientes de antibióticos, es el método de dilución en agar
- b) Series de tubos, con caldo de cultivo, que contienen concentraciones crecientes de antibióticos, es el método de dilución en caldo

Con ambos métodos es posible conocer la Concentración Mínima Inhibitoria CIM y la Concentración Mínima Bactericida CMB, de un antibiótico.

CMI, es la mínima concentración que inhibe el crecimiento de una bacteria

CMB, es la mínima concentración de antibiótico capaz de matar a la bacteria

Entre los métodos más modernos, se puede citar el E-Test y los métodos de microdilución con lectura turbidimétrica

TABLA DE INTERPRETACION DE LOS HALOS DE INHIBICION

ANTIBIOTICO	POTENCIA (ug)	DIAMETRO DE HALO (mm)	
		RESISTENTE	SUSCEPTIBLE
ACIDO NALIDIXICO	30	13	19
AMIKACINA	30	14	17
AMPICILINA (Bac.Gram-)	10	11	14
AMPICILINA (<i>Haemophilus</i>)	10	19	20
AMPICILINA (Enterococo)	10	16	30
AZTREONAM	30	15	22
BACITRACINA	10U	8	13
CARBENICILINA (<i>Pseudomonas</i>)	100	13	17
CEFALOTIN	30	14	18
CEFAZOLINA	30	14	18
CEFOPERAZONA	75	15	21
CEFOTAXIMA	30	14	23
CEFTAZIDIMA	30	14	18
CEFTIZOXIMA (<i>P. aeruginosa</i>)	30	10	11
CEFTIZOXIMA (otros microorg.)	30	14	20
CEFTRIAXONA	30	13	21
CEFUROXIMA	30	14	18
CIPROFLOXACINA	5	12	19
COLISTIN	10	8	11
COTRIMOXAZOL	1.25/23.75	10	16
CLINDAMICINA	2	14	17
CLORANFENICOL	30	12	18
ENOXACINA	10	12	17
ERITROMICINA	15	13	18
GENTAMICINA	10	12	15
NEOMICINA	30	12	17
NETILMICINA	30	12	15
NITROFURANTOINA	300	14	17
NORFLOXACINA	10	12	17
OXACILINA (<i>Staphylococcus</i>)	1	10	13
OXACILINA (<i>S. pneumoniae</i>)	1	19	20
PENICILINA G (<i>Staphylococcus</i>)	10U	28	29
PENICILINA G (<i>N. gonorrhoeae</i>)	10U	19	20
PENICILINA G (Enterococo)	10U	14	15
PENICILINA G (<i>Streptococcus</i>)	10U	19	28
PENICILINA G (<i>L.monocytogenes</i>)	10U	19	28
TETRACICLINA	30	14	19

VII.- Efecto de los agentes físicos, químicos y mecánicos sobre bacterias

DEFINICIONES:

Esterilización: procedimientos físicos o uso de agentes químicos para eliminar todas las formas viables de las bacterias, incluidas las esporas, virus y hongos.

Desinfección: procedimiento que elimina la mayor parte de formas vegetativas bacterianas, pero no necesariamente esporas y virus.

Desinfectantes: compuestos usados para desinfectar superficies inanimadas. Se clasifican en grados de potencia:

- Alto: elimina *Mycobacterium tuberculosis*, virus y en condiciones especiales puede esterilizar. Se aplica a instrumental semicrítico, es decir, aparatos que toman contacto con mucosas o piel no intacta.
- Medio: elimina bacterias vegetativas, hongos y algunos virus. Podría eliminar *Mycobacterium tuberculosis*
- Bajo: elimina bacterias patógenas vegetativas, algunos hongos y algunos virus. No elimina *Mycobacterium tuberculosis* ni virus desnudos pequeños. Se aplica a instrumentos no críticos, es decir aquellos que toman contacto con piel intacta, como fonendoscopios o también para pisos, utensilios, muebles, etc.

Antiséptico: compuestos químicos usados sobre tejidos vivos, para destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos.

Sanitización: procedimiento cuyo objetivo es disminuir la carga bacteriana a niveles seguros. Se aplican sobre artefactos y utensilios de uso diario.

Compuestos bacteriostáticos: aquellos que inhiben el desarrollo de bacterias.

Compuestos bactericidas o germicidas: aquellos que matan a bacterias, pero no necesariamente las esporas.

La esterilización y desinfección conllevan generalmente a la destrucción, eliminación o inhibición de los microorganismos. Generalmente se realiza esto mediante tres tipos de agentes:

- 1) Agentes Físicos
- 2) Agentes Químicos
- 3) Agentes Mecánicos

1.- Agentes físicos

Calor húmedo

Ebullición: por 2 a 10 minutos eventualmente eliminará las formas patógenas de hongos y bacterias. Sin embargo, no matará esporas de hongos (conidios), ni tampoco destruirá el virus de la hepatitis.

Vapor a presión, Autoclave: para destruir esporas la temperatura debiera ser elevada a 121°C. El uso del autoclave permite elevar la temperatura a 121°C (15 libras de presión) y debe mantenerse en esta por un período no inferior a 15 minutos, contados desde a temperatura.

Pasteurización: algunos alimentos líquidos (leche, jugos, cervezas) se someten a este proceso. Por ejemplo la pasteurización de la leche consiste en calentarla a 62°C por 30 minutos, o bien elevar la temperatura a 71° C por 15 segundos para matar todas las formas vegetativas de las bacterias patógenas presentes en ella; elimina el 100% del Bacilo de Koch, Salmonellas, Streptococos y Brucellas. La muerte por altas temperaturas se debe a desnaturalización de las proteínas (coagulación o hidrólisis) y destrucción de la membrana celular.

2.- Calor seco

Horno: esteriliza cuando los materiales sometidos a este procedimiento, están a una temperatura de 160°C a 170°C por un período mínimo de 120 min. La muerte se debe a coagulación de las proteínas. Con este procedimiento se eliminan esporas y el virus de la hepatitis.

Incineración: es una forma de esterilización terminal. Los materiales son destruidos completamente por la acción del calor. También suele utilizarse para esterilizar el asa de platino destinada a la transferencia de bacterias.

3.- Congelación

Ciclos de congelación y descongelación reducirán considerablemente el número de bacterias viables. Método que es inoperante contra las esporas. La muerte es debida a rotura de la membrana celular.

4.- Liofilización

Consiste en coagular y deshidratar violentamente una muestra. Hay reducción del número de bacterias viables. Sin embargo, este procedimiento más bien es utilizado para conservar bacterias y otras formas vivas. La reducción inicial del número de bacterias no afecta considerablemente la recuperación cuando se trabaja con números tan inmensamente grandes.

Radiaciones

Radiaciones ultravioleta (UV): es una radiación electromagnética. Su longitud de onda varía entre 15 y 400nm. Los rayos UV inciden en los ácidos nucleicos, produciendo modificaciones químicas (dímeros de timina). Hay desprendimiento de peróxido que también pueden jugar algún rol en su efecto bactericida. Una de sus aplicaciones es la esterilización de ambientes y superficies, la radiación UV, no tiene poder de penetración.

Radiaciones gamma : este tipo de radiación es letal a toda célula viva, debido a su alta energía es capaz de penetrar la materia e interactuar con los átomos de las moléculas liberando electrones, es decir es una radiación ionizante. Entre otros, es utilizada para esterilizar alimentos, material de usos médico (plástico desechable).

Agentes mecánicos

Ondas ultrasónicas: destruyen a las bacterias por un proceso de cavitación. Se realiza sólo en suspensión de líquidos. Utilizados para limpieza, no para esterilización.

Filtración: es la remoción de bacterias u otras partículas de la suspensión en líquidos mediante membranas que presentan poros de 0,45 y 0.2 micrómetros de diámetro

Nota: los virus pasan a través de los filtros que ordinariamente retienen bacterias. Lo mismo ocurre con las formas bacterianas privadas de pared celular.

2.- Agentes químicos

Antisépticos

Povidona yodada (8,5 y 10%):

Actúa oxidando e inactivando componentes celulares. Su acción es rápida y al ser soluble en agua permite una liberación gradual del yodo a los tejidos prolongando su efecto pero con menor riesgo de irritación. Espectro de acción amplio.

Alcohol etílico 70%:

Su acción es rápida y actúa desnaturalizando las proteínas. Espectro de acción amplio.

Es volátil e inflamable.

Clorhexidina 2%:

Actúa dañando la membrana celular. Este detergente posee una afinidad alta por la piel, por lo que su acción se puede prolongar hasta 6 horas después de su uso

y además el efecto es acumulativo si se usa periódicamente. Su espectro de acción incluye bacterias Gram positivas y negativas, virus con envoltura, pero su acción es débil frente a hongos y nula frente a *Mycobacterium tuberculosis*

Triclosan 0,5 y 1%

Produce daño a nivel de la pared de microorganismos. Actúa sobre formas vegetativas de bacterias. Su actividad es poco afectada por la presencia de materia orgánica. Uso para el lavado de manos de tipo clínico.

Peróxido de hidrógenos 10 volúmenes al 3%:

Actúa oxidando e inactivando componentes celulares

Desinfectantes

Glutaraldehído 2%: se usa como desinfectante de alto nivel, para instrumental semicrítico. Espectro de acción incluye esporas

Alcohol 70%: se usa como desinfectante de nivel intermedio, bajo. Espectro: no incluye esporas

Cloro 10% solución madre (0,5% sol de uso): desinfección de pisos y baños. Espectro de acción amplio

Detergentes amonio cuaternario: actúan destruyendo las membranas celulares. Dejan un film de depósito sobre las superficies, lo que prolonga su acción, Desinfección de bajo nivel y sanitización.. Espectro reducido

Esterilización

Oxido de etileno (EtO): usado para esterilizar material sensible al calor, dispositivos médicos, productos farmacéuticos. Requiere de instalaciones especiales, pues es tóxico y explosivo

VIII.- Microbiota Normal

No sólo en el aire, aguas y tierra se encuentra una gran diversidad de microorganismos sino que hay además un conjunto de microorganismos, principalmente bacterias que se normalmente se localizan en diferentes órganos del cuerpo humano. Estos microorganismos se denominan “microbiota normal” y generalmente establecen una relación de comensalismo con su hospedador.

La colonización microbiana del individuo, comienza con el nacimiento. Los primeros microorganismos en establecerse son aquellos transferidos al momento del nacimiento, a través del canal del parto, con la primera respiración del recién nacido y al recibir las primeras atenciones de quienes le rodean.

Microbiota normal está compuesta mayoritariamente por bacterias y un número menor de virus, hongos y parásitos. Éstos se encuentran con frecuencia en personas sanas y no les causan enfermedad.

La microbiota presente en la superficie y en los órganos conectados al exterior sufre un flujo continuo durante la vida del individuo y esto estaría influenciado por diversos factores como la edad, nutrición, estado de salud, higiene y estado hormonal, por ejemplo.

En el ámbito de la clínica, se sabe que sólo una pequeña fracción de las enfermedades infecciosas son ocasionadas por agentes externos, dicho de otro modo, la mayoría de los casos son causado por bacteria que son miembros de la microbiota y que por circunstancias especiales cambian de hábitat.

La microbiota tiene una composición numerosa y diversa. Para abordar su estudio se ha recurrido a clasificar los ambientes biológicos del hombre, pues la microbiota basal es característica de cada ambiente. Es necesario mencionar que existe una “microbiota transitoria” que es variable de un ser humano a otro, compuesta por bacterias que están presentes en forma intermitente e incluso a veces corresponden a bacterias patógenas.

Entre estos ambientes biológicos del cuerpo humano se describen zonas con alta presencia y zonas con escasa presencia de microbiota y también zonas estériles.

Otro detalle que debemos agregar es que el número de anaerobios estrictos tiende a exceder en número a las formas facultativas y aerobias por un factor de 10 a 100 o más.

Microbiota Normal

<p>1.- Piel</p> <p><i>Staphylococcus epidermidis</i> Difteroides <i>Propionibacterium acnes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus</i> (incluye grupo A) <i>Peptococcus</i> (micrococos anaeróbicos) Candida spp. Bacilos Gram negativos</p>	<p>6.- Intestino delgado</p> <p>Lactobacilos <i>Enterococcus</i> Bacteroides <i>E. coli</i></p>
<p>2.- Boca y faringe</p> <p><i>Streptococcus</i> <i>Pneumococcus</i> (20-40%) <i>Peptostreptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Abiotrophia</i> <i>Stomacoccus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Neisseria</i> Veillonella</p> <p><i>Actinomyces</i> spp Bifidobacterium Corynebacterium Eubacterium Lactobacilo spp Propionibacterium Rothia</p> <p><i>Haemophilus influenzae</i> (40-80%) Difteroides <i>Actinobacillus</i> <i>Campylobacter</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Eikenella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Klebsiella</i> spp <i>E. coli</i> Candida albicans</p>	<p>7.- Intestino grueso (90-95% son anaerobios obligados existen > 300 especies).</p> <p><i>Bacteroides</i> spp. <i>E. coli</i> <i>Enterococcus</i> Lactobacilos <i>Klebsiella</i> spp. <i>Actinomyces</i> <i>Fusobacterium</i> spp. Difteroides <i>Clostridium perfringens</i> <i>Candida albicans</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>S. aureus</i></p>
<p>3.- Dientes y crevice gingival</p> <p><i>Lactobacilo</i> spp. Bacteroides spp. <i>Streptococcus mutans</i> <i>Actinomyces</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.</p>	<p>8.- Hígado, vesícula y peritoneo:</p> <p>Normalmente no hay microorganismos</p>

Espiroquetas	
4.- Senos nasales, laringe, tráquea, bronquios y pulmones: Generalmente estériles	
5.- Fosas nasales <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (20-50%) <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> (neumococos) <i>Haemophilus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp.	9.- Tracto genitourinario <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>E. coli</i> Lactobacilos <i>Candida albicans</i> <i>Bacteroides</i> <i>Clostridium</i> spp.

NOTA: Este listado no incluye todos los microorganismos presentes o que pueden formar parte de la microbiota del cuerpo humano.



IX MICROBIOLOGIA DE LAS IAAS

Definición de caso de IAAS:

Procesos infecciosos locales o generalizados causados por agentes biológicos de origen endógeno o exógeno, que se asocian a hospitalización o consulta de un paciente. Son procesos que no corresponden al motivo de consulta ni estaban en periodo de incubación al momento de ésta. Incluye procesos infecciosos que se presentan 48 a 72 h post hospitalización y también post alta, 30 días hasta un año, dependiendo del caso”

* Se acepta la aparición a las 24 h cuando está asociada a un procedimiento invasivo.

Impacto de las IAAS en Chile

Complicación frecuente y severa de la atención hospitalaria. 80% secundarias a procesos invasivos

Prevalencia 8 a 10%

Letalidad 6 a 10% (3.000 a 6.000 muertes/año)

Aumento del costo de hospitalización por: Aumento en 5 a 20 días ó más de hospitalización, según tipo de IAAS. Mayor uso de medicamentos. Mayor número de exámenes. Necesidad de aislamiento. Desvío de recursos en salud

Costo indirecto por: Días laborales perdidos, discapacidad, subsidios, carga psicológica, muerte temprana

Aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad

1/3 de los casos serían prevenibles

Las IAAS son causadas principalmente por bacterias y en menor frecuencia, aunque en aumento, por virus, levaduras y hongos filamentosos.

Ecología de las IAAS

Comprende una cadena de eventos:

Características de los agentes biológicos: patogenicidad, virulencia, dosis infectante, tropismo

Reservorio de agentes, que son los pacientes mismos, sus visitas, el personal de salud y el ambiente

Puertas de entrada y salida de los agentes: cuando el reservorio es humano, las “puertas” corresponden sistemas comunicados con el ambiente, por ejemplo tracto digestivo y respiratorio.

Mecanismos de transmisión: circunstancia que permite que el agente biológico presente pueda “tomar contacto” con un hospedador.

Paciente susceptible: persona que tiene algún factor predisponente que lo hace vulnerable a adquirir una IAAS. Por ejemplo: edades extremas, co-morbilidad, estado nutricional, estado inmunitario (tratamiento inmunosupresores), hospitalización prolongada, tratamientos con antimicrobianos de amplio espectro, haber sido sometido a procedimientos invasivos.

Factores del ambiente: Aire, agua, superficies, objetos, desechos hospitalarios. Protocolos de procedimientos del establecimiento de atención.

Los agentes exógenos: provienen desde fuera del paciente, es decir, provienen del ambiente o de de otras personas.

Agentes endógenos: provienen de la microbiota del paciente que ha perdido el equilibrio con su hospedador y por tanto pueden comportarse como “agentes oportunistas” y causar enfermedad. Es importante recordar que un paciente hospitalizado puede incorporar a su microbiota agentes que estén presentes dentro del ambiente hospitalario (agentes “exo-endógenos”).

Algunas definiciones

AGENTE PATOGENO: Aquellos que causan las enfermedades infecciosas

PATOGENESIS: Cómo puede causar daño

PATOGENICIDAD: Capacidad para causar daño

VIRULENCIA: Expresión cuantitativa de la patogenicidad (expresión cuantitativa de la capacidad para ocasionar daño). Es una propiedad característica de cada cepa bacteriana

DOSIS INFECTANTE: número de microorganismos necesarios para causar una infección

TROPISMO: (del griego *tropé*=giro), ilustra como el agente es “atraído” por el tejido donde encontrará los receptores para adherirse e iniciar su proceso de colonización.

COLONIZACIÓN: Presencia de microorganismos en la piel o en mucosas, sin evidencias de respuesta específica clínica o inmunológica.

INFECCIÓN: Respuesta específica del organismo frente a la presencia de agentes biológicos, hay desarrollo de respuesta inmune. Una infección puede ser localizada o generalizada y puede cursar en forma subclínica o asintomática ó como Enfermedad Infecciosa, es decir con presencia de signos y síntomas atribuibles a la presencia de un agente infeccioso.

Pasos obligados que deben cumplir los agentes patógenos (Patogénesis)

- 1.- Exposición del paciente
- 2.-Contacto del agente con el hospedero susceptible
- 3.- Entrada del agente
- 4.-Contacto del agente con el tejido blanco
- 5.-Adaptación del agente, logrando así establecerse (colonización)
- 6.- Diseminación e Invasión (enfermedad infecciosa)
- 7.- Transmisión (el agente completa su ciclo y va hacia otro hospedador)

La introducción de los antimicrobianos al arsenal terapéutico, en la década de los cuarenta, dio una solución al problema de las infecciones, pero sólo por corto tiempo, pues con rapidez se constató la aparición de microorganismos resistentes, principalmente en los hospitales, lo que obligó a crear un programa de control de IIH en USA en los años cincuenta. Ya en los años 70-80 aparecen cepas multirresistentes. En Chile el programa para el control de infecciones intrahospitalarias se inicia en 1982.

Principales IIAS

La frecuencia varía según el centro hospitalario y la complejidad del servicio

Neumonías: entre los factores de riesgo detectados: Generales del hospedador. Condiciones que favorecen aspiración o reflujo. Factores que impiden una adecuada ventilación pulmonar. Uso prolongado de ventilación mecánica. Agentes etiológicos: *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Staphylococcus coagulasa* (-), *Pseudomonas*, *A. baumannii*, Virus Sincicial Respiratorio, Adenovirus.

Infección de Herida Operatoria (IHO): entre los factores de riesgo detectados se puede citar: Estada preoperatoria prolongada. Rasurado preoperatorio. Presencia de focos distales. Duración de cirugía. Drenajes abdominales. Técnica quirúrgica Factores de resistencia del hospedador. Agentes causales implicados. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa* (-), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*.

Infección del Torrente Sanguíneo (ITS) (relacionada a CVC): entre los factores de riesgo detectados se puede citar: los concernientes al paciente: ingreso en UCI, ingreso en Neonatología, Recién nacido de bajo peso, Inmunodeprimidos, Enf de base y a la atención hospitalaria: Cateterización (CVC). Agentes causales implicados: *Staphylococcus aureus*, *Stafilococcus coagulasa* (-), *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Cándida* sp.

Infección del tracto urinario (ITU): entre los factores de riesgo detectados se puede citar: los concernientes al paciente y a la atención hospitalaria. Agentes etiológicos: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Cándida albicans*, *Enterobacter* sp.

Endometritis puerperal: entre los factores de riesgo que se postula pueden jugar un rol se puede citar: De la paciente: Obesidad. Pobreza. Tiempo de membranas rotas. Tiempo de trabajo de parto. De la atención hospitalaria: Parto por cesárea, número de tactos vaginales, profilaxis antibiótica. Agentes etiológicos: el diagnóstico etiológico sólo se logra en 25 % de los casos, en general son infecciones endógenas (microbiota anaerobia y aerobia de la vagina), *E. coli*, *S. aureus*, *Estafilococos coagulasa* (-), *Enterococcus*, *S. pyogenes*.

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LOS AGENTES NOMBRADOS

Características de *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria ubícua y cosmopolita.

Resistente a condiciones ambientales, agentes químicos y físico

Forma parte de la microbiota normal de individuos (nariz, piel, cuero cabelludo, orofarínge y tracto urogenital), es decir es posible la transmisión exógena

Grupos de riesgo: pacientes hospitalizados con traumatismos o sometidos a cirugía o instrumentalizados, presencia de cuerpo extraño. Pacientes tratados con

antimicrobianos que suprimen la microbiota normal. Lactantes y niños menores (SPEE).

Enfermedades causadas por *S. aureus*

I.- Procesos piógenos

Impétigo, Orzuelo, Foliculitis, Forúnculo, Antrax estafilocócico
Infecciones de herida operatoria
Bacteremia y endocarditis
Neumonía y empiema
Osteomielitis y artritis séptica

II.- Procesos tóxicos

Síndrome de la piel escaldada
Síndrome de shock tóxico (SST)
Intoxicación alimentaria estafilocócica

Se puede agrupar las cepas de *S. aureus*, según los patrones de resistencia que presentan:

▸ **Cepas β - lactamasa (+):** es frecuente y está asociada a la presencia de un plásmido. Confiere resistencia a muchos betalactámicos, por ejemplo: penicilina G, ampicilina, piperacilina.

▸ **Cepas MRSA:** resistentes a metilina. La resistencia a metilina se debe a la síntesis de una PBP distinta que está codificada por una serie de genes que se encuentran en el cromosoma en los denominados "casette cromosómico estafilocócico *mec*" (*SCCmec*). Se describen cuatro, siendo los *SCCmec* I, II y III, los que están asociados a infecciones intrahospitalarias.

▸ **Cepas VISA :** han sido aisladas en Japón y USA, en pacientes sometidos a tratamiento antimicrobianos muy prolongados. Para estas cepas el tratamiento con vancomicina no ha sido eficaz. Se ha detectado en estas cepas un aumento en la síntesis pared y alteraciones de ella.

▸ **Cepas VRSA:** aisladas en el 2002, estas cepas poseían el gen *vanA* de los Enterococos y eran resistentes a metilina, pero presentaban susceptibilidad a otros antimicrobianos.

Además las cepas de *S. aureus* pueden poseer otros plásmidos que les confieren resistencia a tetraciclina, eritromicina, aminoglicósidos y otros.

Profilaxis

Lavado de manos minucioso y cobertura de las superficies cutáneas expuestas
Aseo prolijo de habitaciones y fomites dentro del hospital
Desinfección y limpieza de heridas
Control de manipuladores de alimentos
Tratamiento o cambio de lugar de trabajo de personal hospitalario portador

Características de *Staphylococcus coagulasa negativos*

Ubícuos. Cosmopolitas

Pueden sobrevivir en superficies secas largo tiempo

Forma parte de la microbiota normal de individuos (nariz, piel, cuero cabelludo, orofarínge y tracto urogenital)

Transmisión de persona a persona por contacto directo ó exposición a fomites contaminados.

Infecciones de origen endógeno.

Grupo de riesgo: pacientes hospitalizados portadores de catéteres o prótesis.

Relativamente avirulentos. Gran capacidad de formar biopelícula

Causan: Endocarditis, Sepsis, ITU, Infecciones de catéteres, cortocircuitos y prótesis, IHO

Características del Genero *Enterococcus*

Dos especies de importancia: *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*

Ubícuos. Capacidad de sobrevivir en medio ambiente por largo tiempo.

Factores de patogenicidad: capacidad de adherencia mediante proteínas y adhesinas hidrogenadas. Secreción de citolisinas, proteasas y enzimas para la resistencia a antimicrobianos

Forma parte de microbiota intestinal del hombre y animales

Causa infecciones nosocomiales, la mayoría de origen endógeno

Pacientes con riesgo: hospitalizaciones prolongadas, tratamientos con antimicrobianos de amplio espectro.

Causan: Endocarditis, ITU, IHO

Características de la Familia *Enterobacteriaceae*

Asociadas a IAAS: *E. coli*, *lebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*

Forman parte de la microbiota intestinal

Causan infecciones en su mayoría de tipo endógenas

Factores de patogenicidad: Endotoxina, cápsula, sideróforos, variación de fase antigénica, sistema de secreción tipo III, resistencia a efecto bactericida del suero, resistencia a antimicrobianos

Causan: ITU, IHO, ITS

Características de Bacilos Gram negativos No Fermentadores:

(*Burkholderia*, *Moraxella*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*)

Principales asociadas a IAAS: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*

Oportunistas, ubícuos en ambientes húmedos: flores, artefactos sanitarios, equipos de diálisis, de ventilación.

Pueden colonizar transitoriamente tracto respiratorio, digestivo de pacientes hospitalizados

Factores de riesgo: hospitalización prolongada, tratamientos con antimicrobianos de amplio espectro, ventilación mecánica, quemaduras

Factores de patogenicidad: adhesinas, enzimas, toxinas, resistencia a antimicrobianos

Causan: Infecciones respiratorias, urinarias, de piel y tejidos blandos, ITS, endocarditis

Características de Rotavirus

Virus ARN, desnudos

Cosmopolitas

Se transmiten por vía fecal-oral y posiblemente respiratorios

Causan diarrea y deshidratación en lactantes

Durante la fase diarreica se elimina gran cantidad de virus

Características de Adenovirus

Virus ADN, desnudos

Se transmiten por contacto (gotitas, deposición, piscinas), fomites

Pacientes en riesgo: niños menores de 14 años. Residentes de lugares cerrados

Causan: laringotraqueobronquitis, fiebre faringoconjuntival. Algunos biotipos causan gastroenteritis

Características de Virus Sincicial Respiratorio (VRS)

Pertenece a los Paramixovirus

Virus ARN con envoltura

Dos tipos antigénicos

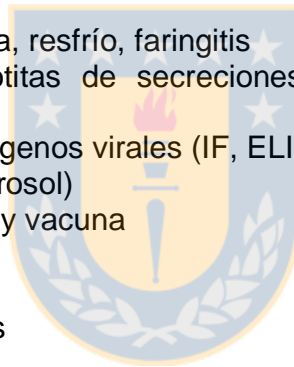
Causa: bronquiolitis, neumonía, resfrío, faringitis

Transmisión a través de gotitas de secreciones respiratorias, de persona a persona

Diagnóstico: detección de antígenos virales (IF, ELISA)

Tratamiento: RIBAVIRINA (aerosol)

Profilaxis: Ig específica. No hay vacuna



Infecciones fúngicas invasoras

Levaduras

Candidas spp

Algunas especies forman parte de la microbiota de la piel y tracto gastrointestinal

La candidosis es la micosis sistémica más común y las especies implicadas con mayor frecuencia son: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis*

Factores de riesgo: co-morbilidad, tratamientos con antimicrobianos de amplio espectro, tratamientos inmunodepresores, alimentación parenteral.

Cryptococcus neoformans

Ampliamente distribuido a nivel mundial. Frecuentemente se aísla de heces secas de palomas.

Se adquieren por inhalación. Es una levadura neurotrópica, por lo que desde el plumón migra al sistema nervioso central causando meningoencefalitis

Factores de riesgo: cuadros inmunodepresores como cánceres hematógenos, VIH/SIDA.

Hongos filamentosos

Aspergillus spp.

Las infecciones se adquieren de fuentes exógenas, por inhalación

Las infecciones localizadas no invasoras (colonización) pueden afectar los senos paranasales, el conducto auditivo. Se puede presentar colonización fúngica de una cavidad preexistente (ej: absceso pulmonar) sin invasión a tejidos contiguos. La enfermedad sistémica en que afecta tracto gastrointestinal, riñón, hígado, etc., es rara

Factores de riesgo: pacientes que sufren tuberculosis, sarcoidosis o enfisemas (patologías cavitarias), inmunodepresión.

Fusarium sp.

Son hongos saprofitos, abundantes en la naturaleza.

Las infecciones por este tipo de agentes son poco frecuentes y afectan a personas con inmunodepresión profunda.

Funciones del Laboratorio de Microbiología en el control de las IAAS

Diagnóstico de los microorganismos patógenos

Caracterización de los agentes desde el punto de vista de los marcadores epidemiológicos

(biotipo, serotipo, genotipo)

Orienta a los clínicos sobre los patrones de Resistencia/Sensibilidad (antibiotipo)

Contribuye en la selección y evaluación de desinfectantes y antisépticos



X.- ESQUEMAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS, EN LABORATORIO

BACTERIAS GRAM POSITIVAS COCACEAS

Catalasa Positiva		
<i>Staphylococcus, Micrococcus, Stomatococcus, Alloiococcus</i>		
Test Bacitracina		
Resistente		Susceptible
<i>Staphylococcus</i>		<i>Micrococcus</i>
Test coagulasa		
Positiva	Negativa	
<i>S. aureus</i>		
Test Novobiocina		
S		R
S. coagulasa (-) No saprophyticus	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	

BACTERIAS GRAM POSITIVAS COCACEAS

Catalasa Negativa			
<i>Streptococcus, Enterococcus</i>			
<i>Streptococcus</i>			
Alfa	Beta		Gamma
	Bacitracina S	Test látex:	
	S. grupo A	<i>Streptococcus</i> Grupos A,B,C,D,F,G	
Optoquin Resistente: Grupo <i>viridans</i>			Bilis esculina NaCl 6,5%: <i>Enterococcus</i>
Optoquin susceptible: <i>S. pneumoniae</i>			
Bilis(+) NaCl (+): <i>Enterococcus</i>			

BACTERIAS GRAM POSITIVAS BACILOS

Catalasa Positiva/Aspecto al Gram		
Bacilos grandes, esporulados con bordes netos	Bacilos en empalizada	Bacilos finos
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS BACILOS

Fermentan Glucosa Test oxidasa (-) Crecen en Mc Conkey		No Fermentan Glucosa Test oxidasa (+) Crecen en Mc Conkey	Crecimiento lento Requieren suplementos No crecen en Mc Conkey
Enterobacteriaceae		Bacilos no fermentadores	Fastidiosos
Identificación Bioquímica		Identificación Bioquímica	Pruebas especiales
Lactosa (+)	Lactosa (-)	Ej: <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> ,	Ej: <i>Brucella</i> , <i>Bordetella</i> , <i>Legionella</i> , <i>Bartonella</i>
<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i>	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> <i>Proteus</i> <i>Citrobacter</i>		

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS COCACEAS

Disposición “grano de café” Oxidasa (+)
<i>Neisseria sp.</i>

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS COCOBACILOS

Crecimiento lento Requieren suplementos No crecen en McConkey
Fastidiosos
Requieren pruebas especiales para su identificación
Ej: <i>Haemophilus</i> , <i>Klingella</i> , <i>Eikenella</i>

ANEXOS DEL MODULO PARASITOLOGIA

I.- Examen Parasitológico Seriado de Deposición

Requisitos para obtener una correcta muestra de deposiciones, para el examen parasitológico.

Deberá insistirse ante el paciente, sobre la importancia que tiene el cumplimiento exacto de las medidas que a continuación se indican:

- 1.- El paciente debe defecar en un recipiente limpio y seco.
- 2.- No debe mezclar la deposición con orina u otras materias extrañas.
- 3.- No debe haber ingerido purgantes oleosos, fármacos a base de bario, bismuto o carbón, ni medicamentos contra la o las parasitosis que se desea estudiar. Si ya el paciente estuviese recibiendo estos medicamentos, es necesario suspenderlos y esperara cuatro días o más, antes de tomar la muestra.
- 4.- Para su envío al laboratorio, debe tomarse una muestra fresca de deposición, con ayuda de la paleta de madera, en una cantidad equivalente a la mitad del contenido líquido del frasco. Mezclar hasta obtener una solución homogénea. (El laboratorio de Parasitología, proporciona envases plásticos especiales, que contienen una solución fijadora adecuada para preservar la muestra).
- 5.- Si en la muestra se observa presencia de gusanos u otros elementos parasitarios, estos se deben colocar en un frasco limpio aparte, con AGUA DE LA LLAVE solamente y enviarlos al laboratorio antes de 48 horas.
- 6.- En los lactantes, lo adecuado es tomar la muestra recién emitida (mientras el niño está defecando).
- 7.- Para el examen parasitológico de deposiciones sirven muestras obtenidas a cualquier hora del día, por lo tanto no es necesario que el paciente esté en ayunas.
- 8.- Si un paciente sufre disentería, lo más adecuado es recoger las muestras con fijador PAF (Fenol-Alcohol-Formol) o PVA (Alcohol Polivinílico). Si no se dispone de ellos, se colocará en frascos limpios y secos y deberá ser llevada de inmediato al laboratorio.
- 9.- Es importante considerar que el resultado negativo de un solo examen aislado no siempre descarta la presencia de una parasitosis intestinal, porque muchos parásitos eliminan irregularmente los elementos que permiten identificarlos. Por eso se usa el examen **seriado** de deposiciones, es decir, día por medio se va obteniendo una muestra hasta completar la serie que brinda el máximo de seguridad diagnóstica (mínimo tres muestras).

Las técnicas de uso más corriente para la realización de un PSD, son:

1.- Método de Telemann modificado (formol-sal): Permite la investigación de quistes de protozoos y de huevos de helmintos de parásitos intestinales, a partir del examen parasitológico seriado de las deposiciones.

2.- Método de Burrows o PAF (Fenol- alcohol- formol): Permite tanto la visualización de quistes y trofozoitos de protozoos como huevos de helmintos.

II.- METODO O TEST DE GRAHAM

Este examen se utiliza para el diagnóstico de la infección de *Enterobius vermicularis*. Se requiere un trozo de aproximadamente tres cm de largo de cinta transparente adhesiva que se adhiere a un portaobjetos limpio. Se hace un doblez en uno de los extremos del celofán, para poder desprenderlo fácilmente al momento de tomar la muestra. El laboratorio entrega listas estos portaobjetos (6 en total).

1.- La noche anterior a la toma de muestra se debe realizar un buen aseo. No aplicar cremas en la zona perineal. Dormir con calzón ó slip ajustado.

2.- Las muestras deben tomarse siempre en la mañana, al despertar, antes de defecar o de efectuar el aseo matinal.

2.- Para obtener la muestra, usted debe indicar a la madre o al paciente que despegue la cinta adhesiva desde el portaobjetos y aplique la cinta por su lado engomado, varias veces en la zona que rodea el orificio anal. A continuación vuelva a pegar la cinta en el portaobjeto de vidrio, presionando suavemente. Después de haber tomado la muestra, la persona debe lavarse muy bien las manos con abundante agua y jabón, escobillándose bien las uñas.

Esta operación debe repetirla por 6 mañanas consecutivas, utilizando un portaobjeto diferente cada vez, luego de lo cual deberá envolverlos, para llevarlos al laboratorio.

Bibliografía

- 1.- Forbes, Sahm, Weissfeld. Bayley & Scott Diagnóstico Microbiológico, 11ª Edición, Buenos Aires, Médica Panamericana 2004
- 2.- Abarca K., García P., Vial P. Microbiología Clínica. Ediciones U. Católica de Chile. 2001
- 3.- Kenneth J.R., Ray C. G., Ahmand N., Drew W.L., Plorde J. Sherris Microbiología Médica. 5º Ed. McGrawHill, 2010
- 4.- A. Atías M. Parasitología Médica. Ed. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Santiago, Chile.1998.
- 5.- Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller. Microbiología Médica 6º Ed. Madrid: Elsevier Mosby, 2009
- 6.- Brooks G., Carroll K., Butel J., Morse S., Mietzner T. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología Médica. 25ª Ed. McGrawHill, 2010
- 7.- Martín Yagui Moscoso. Las infecciones intrahospitalarias en Perú. Disponible en: http://www.epiredperu.net/epired/cursos/epidemiologia_res-mh-06ll/epires_15.pdf
- 8.- Exceso y estructura de costos de las infecciones intrahospitalarias en un hospital de nivel terciario de Valparaíso, Chile. 1999
Patricio Nercelles, Rosa Herrera, Luisa Peirano y María Lucrecia Villarroel
Disponible en: <http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/123456789/3138/1/BVC10003092.pdf>.
- 9.- Susan S. Huang, M.D., *et al.* Targeted versus Universal Decolonization to Prevent ICU Infection
Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1207290>