

Diagnóstico bacteriológico

Judith C. Bernstein
Nora B. Molina

1º edición

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Bernstein, Judith Celina

Diagnóstico bacteriológico / Judith Celina Bernstein ; Nora Beatriz Molina. - 1a ed. -
La Plata : Judith Celina Bernstein, 2025.
63 p. ; 30 x 21 cm.

ISBN 978-631-00-7809-0

1. Diagnostico bacteriológico . 2. Microbiología. I. Molina, Nora Beatriz II. Título
CDD 616.07581

Fecha de catalogación: 19 de marzo de 2025

Fecha de la impresión: marzo de 2025

Editado e impreso en la Facultad de Ciencias Médicas. Calle 60 y 120 S/N, La Plata,
Buenos Aires, Argentina.

+54 221 4258987

ISBN 978-631-00-7809-0



DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

AUTORAS

Judith Celina Bernstein

Doctora en Medicina, Universidad Nacional de La Plata.

Especialista consultor en Infectología

Especialista en docencia universitaria

Profesora Titular. Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Jefa del Departamento de Articulación de Ciencias Básicas y Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Investigadora y miembro del Consejo Directivo del Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMyP) - Centro asociado a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) - UNLP

Ex Jefa de la Unidad de Infectología, Hospital Zonal General de Agudos "Mi Pueblo", Florencio Varela, provincia de Buenos Aires.

Nora Beatriz Molina

Doctora en Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Magister en Ciencias del Laboratorio Clínico, UNLP

Bioquímica Especialista en Microbiología Clínica

Profesora Asociada. Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas, UNLP

Profesora Adjunta. Coordinadora de Microbiología de las Enfermedades Infecciosas. Carrera Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP

Investigadora y miembro del Consejo Directivo del Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMyP) - Centro asociado a la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) - UNLP

Member of the Latin American Coalition for *Escherichia coli* Research (LACER)

*Dedicamos este libro a nuestras familias, por su invaluable apoyo y
paciencia.*

EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se basa en 3 pilares: el diagnóstico epidemiológico, el diagnóstico clínico y el de laboratorio.

Los primeros datos que nos aproximan al diagnóstico de un proceso infeccioso son los suministrados por la anamnesis y la exploración física del enfermo.



Figura 1. Los 3 pilares del diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Sin embargo, el diagnóstico de certeza de una enfermedad infecciosa se obtiene por la demostración del agente causal. Es decir que, para realizar el diagnóstico de certeza de una enfermedad infecciosa, se debe demostrar la presencia del agente productor o de la huella que éste ha dejado en su contacto con el sistema inmunológico del individuo. El diagnóstico clínico siempre que sea posible debe ser confirmado por un diagnóstico de laboratorio.

EL DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DEFINITIVO DE LA ENFERMEDAD INFECCIOSA SE OBTIENE POR LA DEMOSTRACIÓN DEL AGENTE CAUSAL

Por otro lado, un mismo microorganismo puede dar una gran variedad de cuadros clínicos, en una o varias localizaciones. Por todo ello, la única confirmación de un diagnóstico infectológico clínico es el diagnóstico etiológico, que ofrece el laboratorio de microbiología clínica.

El diagnóstico microbiológico resulta fundamental, tanto para precisar la fase de la infección en la que se halla el paciente, como para definir el tratamiento más adecuado a seguir. A su vez, un diagnóstico y tratamiento precoz tiene un impacto importante en la reducción de la morbilidad y mortalidad de las enfermedades infecciosas.

La relación entre el médico y el microbiólogo es fundamental para conocer la epidemiología nosocomial y prevenir infecciones hospitalarias o asociadas al cuidado de la salud.

El proceso diagnóstico en Bacteriología se inicia con la decisión de toma de muestra y finaliza con la interpretación de los resultados. En la fase preanalítica se realizan las tareas de toma de muestras, transporte y registro en el laboratorio; en la fase analítica las muestras se procesan, analizan y se obtienen los resultados y, por último, en la postanalítica, se realiza la validación de los resultados, la emisión de los informes y finalmente el médico es quien interpreta y contextualiza los resultados informados por el microbiólogo. Toda la información diagnóstica que el laboratorio de microbiología puede proporcionar, dependerá de la calidad de la muestra recibida. Por ello, una toma mal realizada, pobremente recogida o mal transportada determinará un posible fallo en la recuperación de los agentes patógenos o de la microbiota normal, que puede inducir a errores diagnósticos, e incluso a un tratamiento inadecuado del enfermo. Los médicos necesitan que los resultados proporcionados por el laboratorio sean precisos, significativos y clínicamente relevantes. Para proporcionar ese nivel de calidad, el laboratorio requiere que las muestras microbiológicas sean correctamente seleccionadas, recogidas y transportadas, ya que esto permite optimizar su análisis e interpretación. Este hecho es bien conocido por los microbiólogos, pero no tanto por muchas de las personas que realizan las tomas de muestras en clínicas, salas y consultas, por lo que es necesaria la capacitación continua del personal sanitario, al que hay que concienciar del gasto inútil y la falsedad de los datos obtenidos a partir de una analítica realizada de forma inadecuada.

El médico deberá conocer exhaustivamente los tipos de muestras que son más útiles en una infección determinada, el modo de obtenerlas y transportarlas, cuáles son los microorganismos que forman parte de la flora normal y si pueden ser o no patógenos en determinadas circunstancias. Además, es fundamental que pueda interpretar adecuadamente los resultados del examen directo, los cultivos y conocer la susceptibilidad a los antimicrobianos de los microorganismos aislados.

La incorporación de métodos rápidos de diagnóstico y la automatización del laboratorio de Microbiología han permitido acelerar y optimizar el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Se han ido desarrollando equipos automatizados que siembran una amplia variedad de muestras. A esta automatización se han unido las técnicas de diagnóstico rápido de tipo inmunológico, detección de antígenos, la incorporación de técnicas de biología molecular y proteómica.

Una vez finalizado el procesamiento de la muestra, el microbiólogo elaborará un informe, el cual deberá ser interpretado por el médico para tomar las acciones correspondientes, las cuales serán de su exclusiva responsabilidad

PASOS DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Los pasos para el diagnóstico bacteriológico son una secuencia de acciones que el médico, en conjunto con el microbiólogo, deben realizar para arribar al diagnóstico correcto del agente etiológico de una enfermedad infecciosa bacteriana. Estos pasos son:

- 1. Decisión y selección de la muestra microbiológica a tomar**
- 2. Recolección y transporte de muestras microbiológicas**
- 3. Procesamiento de la muestra microbiológica**
 - 3.1. Examen directo**
 - 3.2. Cultivo**
 - 3.3. Tipificación del germen**
 - 3.4. Antibiograma**
 - 3.5. Métodos rápidos**
- 4. Informe de los resultados obtenidos**
- 5. Interpretación de los resultados**

1. DECISIÓN Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA MICROBIOLÓGICA A TOMAR

La toma o recolección de una muestra clínica para estudio microbiológico es un procedimiento especializado que consiste en la obtención de uno o varios especímenes biológicos con el fin de determinar y aislar él o los agentes etiológicos de una probable infección; la finalidad de esto es brindar al médico las herramientas necesarias para la confirmación diagnóstica, la elección de la terapia

antimicrobiana y la conducta epidemiológica a tomar frente al paciente y su entorno. Estos agentes son seres vivos que, al retirarlos de su ambiente habitual, rápidamente pierden su viabilidad. Las principales causas de esta pérdida son la disminución de la temperatura la desecación y el descenso del pH.

Para realizar la investigación microbiológica se puede utilizar prácticamente cualquier tipo de muestra clínica obtenida del paciente. Sin embargo, para obtener un resultado significativo y válido, se deben conocer las normas básicas generales que se describirán a continuación.

A. Tipos de muestras clínicas para estudio microbiológico

Los principales tipos de muestras clínicas utilizadas son,

- 1. Sangre**
- 2. Líquido cefalorraquídeo (LCR)**
- 3. Orina**
- 4. Heces**
- 5. Esputo**
- 6. Secreción respiratoria**
- 7. Muestras respiratorias obtenidas por punción o broncoscopia (lavado bronquioalveolar)**
- 8. Líquido pleural**
- 9. Líquido pericárdico**
- 10. Exudado faríngeo o nasofaríngeo**
- 11. Exudado sinusal**
- 12. Secreción de abscesos**
- 13. Líquido sinovial**
- 14. Líquido peritoneal**
- 15. Exudado endometrial**
- 16. Exudado endocervical**
- 17. Exudado de fondo de saco vaginal**
- 18. Exudado uretral**
- 19. Líquido intraocular**
- 20. Contenido duodenal**
- 21. Tejidos obtenidos por biopsia, punción, aspiración o raspado**

También pueden utilizarse como muestras clínicas algunos dispositivos como:

- 22. Catéteres intravasculares**
- 23. Prótesis**

En la tabla 1 se resumen las principales muestras clínicas recomendadas para el estudio microbiológico de las infecciones de mayor prevalencia.

Tabla 1. Muestras clínicas recomendadas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones más comunes.

Tabla 1.- Muestras clínicas recomendadas para el diagnóstico microbiológico de las infecciones más comunes		
Tipo de infección	Muestra	Comentarios
Bacteriemia		
	Hemocultivos	
Infecciones cardiovasculares y asociadas a dispositivos intravasculares (IV)		
Endocarditis	Hemocultivos/Válvula/Verrugas	
Infección del catéter	Catéter IV, piel pericatóter, conexión del catéter	
Pericarditis	Líquido pericárdico	
Sistema nervioso central		
Meningitis	LCR	
Abscesos cerebrales	Aspirados de abscesos	
Tracto respiratorio		
Faringoamigdalitis	Exudado faríngeo	No válidos los exudados nasales
Sinusitis	Aspirado sinusal	
Otitis media	Timpanocentesis	
Otitis externa	Exudado oído externo	
Neumonía	Espujo, muestras obtenidas por fibrobroncoscopia, punción transtorácica aspirativa, punción transtraqueal, broncoaspirado	
Empiema y abscesos pulmonares	Líquido pleural, aspirados de abscesos	
	Nasofaríngeo	Diagnóstico tosferina/Infecc. víricas
	Nasal	Detección de <i>S. aureus</i>
Infecciones oculares		
Conjuntivitis	Exudado conjuntival/raspado	
Queratitis	Raspado corneal	
Endoftalmitis	Líquido intraocular	
Infecciones gastrointestinales		
Diarrea	Heces/biopsia intestinal/Aspirado duodenal	
Infecciones intraabdominales		
Peritonitis	Líquido peritoneal	
Abscesos intraperitoneales y abscesos viscerales	Aspirados de abscesos	
Colecistitis	Líquido biliar	
Tracto urinario		
Infección urinaria	Orina (micción media, sonda) Orina obtenida mediante punción suprapúbica	Diagnóstico de bacteriuria por anaerobios y de ITU en niños
Tracto genital		
Úlceras genitales	Raspado de la úlcera	
Nódulos genitales	Aspirado del nódulo	
Uretritis	Exudado uretral	
Vulvovaginitis	Exudado vaginal	Detección de <i>S. agalactiae</i> (también exudado rectal) Acompañada de orina pre y post masaje prostático
Cervicitis	Exudado endocervical	
Prostatitis	Secreción prostática	
Piel y tejidos blandos		
Impétigo, foliculitis, erisipela, celulitis, úlceras, infecciones gangrenosas, abscesos cutáneos, heridas y quemaduras	Preferiblemente aspirados tomados con jeringa y biopsias de tejido. Son menos recomendables las muestras tomadas con torundas	
Hueso y articulaciones		
Artritis	Líquido sinovial	
Osteomielitis	Biopsia ósea o exudado	

LCR: Líquido cefalorraquídeo

B. Decisión de la toma de muestra y selección de la muestra a recolectar

La indicación de un estudio microbiológico para confirmar o descartar el diagnóstico presuntivo de una enfermedad infecciosa es decisión del médico, ya que es él quien

tiene la responsabilidad primaria sobre el paciente. Esta decisión debe estar secundada por una serie de conceptos básicos:

- **sospecha de etiología infecciosa** en el cuadro clínico del paciente basada en la anamnesis, estudio físico, etc.
- determinar el **período evolutivo de la enfermedad** para decidir cuáles son las **muestras más representativas** que nos brindarán una mayor posibilidad de aislar el agente causal y cuál es el **momento óptimo** de tomar las muestras
- evaluar el **costo y el beneficio** del estudio para confirmar el diagnóstico clínico presuntivo.

2. RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Una vez que el médico ha tomado la decisión de realizar un estudio microbiológico debe proceder a recolectar la muestra, teniendo en cuenta que la misma debe ser:

- Tomada en el momento óptimo para su recolección
- Representativa del foco infeccioso
- Obtenida para adquirir una adecuada cantidad de material
- Recogida con materiales estériles y con técnica aséptica, siguiendo las normas de Bioseguridad en todo momento
- Colocada en recipiente estéril y adecuado
- Conservada correctamente
- Transportada rápidamente al laboratorio
- Remitida con resumen de historia clínica y diagnóstico presuntivo

El informe microbiológico sólo indicará el resultado del examen microscópico, de los cultivos, la tipificación del germen aislado y el eventual antibiograma. Pero la falta de aislamiento del agente causal o la identificación de varios gérmenes de la flora normal no siempre se debe al empleo de una técnica inadecuada, sino que a veces es la consecuencia de una defectuosa recolección o manipulación de la muestra.

La recolección y el transporte de las muestras clínicas al laboratorio siempre es responsabilidad del médico

Hay situaciones en que es conveniente la recolección de muestras junto a la cama del enfermo (hemocultivo), pero en otras es aconsejable realizarla en el propio laboratorio si se requiere una observación microscópica en fresco y una siembra inmediata.

- **Es indispensable que el material extraído represente fielmente el proceso infeccioso.** Esto significa que la muestra debe ser cuali y cuantitativamente útil. Una expectoración abundante y purulenta es significativa para el diagnóstico de una neumonía; en cambio, un esputo salivoso o mucoso, aunque sea abundante, no sirve porque arrastra flora comensal que se encuentra en saliva.
- **Debe determinarse con sumo cuidado el período de evolución de la enfermedad y el momento óptimo de la extracción;** se describen los siguientes ejemplos:
 - *Bordetella pertussis* es el agente causal de la tos convulsa, pero las posibilidades de su recuperación de nasofaringe declinan con el tiempo, durante el período de incubación se recupera en el 80-90% de los casos, en la etapa paroxística en el 50% y durante la convalecencia en un 20%. Por lo tanto, debe evaluarse cuidadosamente la utilidad de solicitar un estudio bacteriológico según la fase clínica en que se encuentre el enfermo.
 - En el caso de la sífilis, la observación del agente causal (*Treponema pallidum*) por microscopía de fondo oscuro sólo será posible si el chancro sífilítico tiene menos de 15 días de evolución.
 - *Salmonella Typhi*, agente etiológico de la fiebre tifoidea, se recupera de hemocultivos realizados al comienzo de la enfermedad (primera semana); luego, se positivizan los cultivos de materia fecal (segunda semana de la enfermedad) y por último, el diagnóstico debe hacerse en base a técnicas serológicas (aglutinación de Widal) a partir de la tercera semana, ya que no es frecuente la recuperación en los cultivos.
- **Los materiales deben enviarse previa administración de cualquier antibiótico (ATB),** siempre que esto sea posible. Si la muestra fue obtenida bajo tratamiento ATB, siempre se deberá informar al laboratorio cuando se remita la muestra clínica. Es sabido que la obtención de un líquido cefalorraquídeo (LCR) purulento, luego de 24 hs de iniciada la terapia antimicrobiana puede revelar bacterias en la colaboración de Gram, siendo negativo el cultivo ya que, el antimicrobiano inhibe o mata a las bacterias y no desarrollan en los medios de cultivo.

- **La entrega de las muestras biológicas obtenidas al laboratorio debe hacerse siempre en el menor tiempo posible**, para permitir el rápido procesamiento de las mismas, ya que muchos agentes patógenos son sensibles a las condiciones ambientales y pueden perder viabilidad. En las muestras tomadas de zonas normalmente colonizadas, por ejemplo, hisopado faríngeo o esputo, las bacterias comensales pueden proliferar a temperatura ambiente a mayor velocidad que las patógenas, inhibiéndolas y haciendo disminuir su número, por lo tanto, sus posibilidades de recuperación de patógenos serán menores.
- **Cada tipo de muestra requiere su colocación en un recipiente adecuado y estéril para su recolección** e incluso para el transporte de la misma. Todas las muestras deberán ser enviadas lo más rápidamente posible al laboratorio. La mayoría de los microorganismos toleran las temperaturas bajas, por lo que las muestras pueden mantenerse en la heladera unas horas, aunque el LCR, exudados y muestras de bacterias anaerobias **no** deben ser refrigeradas.

En todos los casos, el envío de la muestra debe hacerse en recipientes cerrados. Cuando la viabilidad de las bacterias es muy escasa o la posibilidad de desecación de la muestra es muy grande y la toma de esta no puede realizarse en el mismo laboratorio, se usarán medios de transporte. Se trata de medios tales como el Stuart que preservan las bacterias e impiden el crecimiento exagerado de otra microbiota no deseada. Estos medios pueden ser para bacterias aerobias o anaerobias.

En casos de envíos por correo, siempre se seguirán las normas existentes para el transporte de productos biológicos peligrosos.

En la figura 2 se observan distintos tipos de recipientes utilizados para la recolección y transporte de las muestras obtenidas para estudio microbiológico: frascos de boca ancha, tubos, hisopos, contenedores, etc.

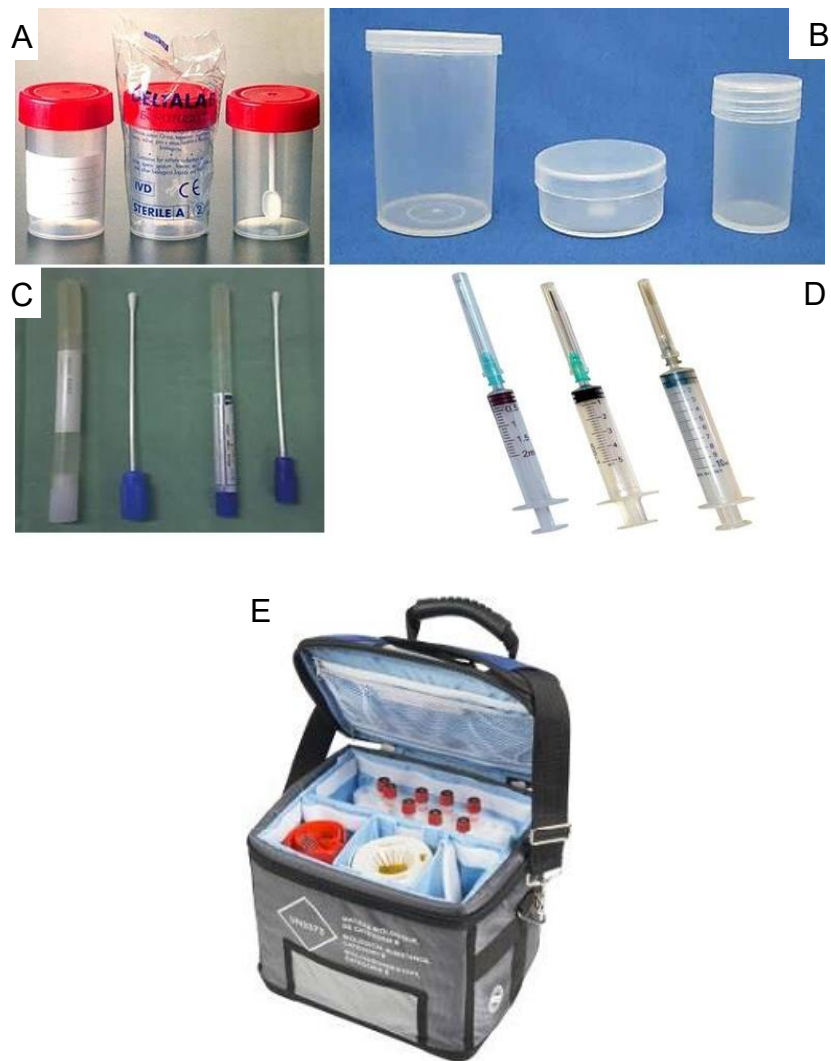


Figura 2. Recipientes para recolección de muestras microbiológicas. A y B: frascos de boca ancha. C: Hisopos con medio de transporte. D: Jeringas para punción. E: contenedor para transportar muestras biológicas

Orden de solicitud de estudio microbiológico

Junto con la muestra debe enviarse la solicitud de análisis microbiológico, la cual debe contener la información clínica más relevante del paciente; estos datos permiten al microbiólogo la selección de medios de cultivo y técnicas adecuadas para identificar el germen causal (Figura 3).

Cada muestra que se remite al laboratorio de microbiología debe ir acompañada de la orden de estudio microbiológico, confeccionada en forma correcta, completa y con letra legible, con el objetivo de suministrar al laboratorio la suficiente información para que la muestra se procese convenientemente y se puedan interpretar los resultados.

Toda orden deberá poseer las cinco áreas siguientes:

1. Filiación y datos administrativos

- nombre y apellido del paciente
- fecha de nacimiento del paciente
- sexo del paciente
- el número de historia clínica y/o, DNI del paciente
- servicio o área de internación y número de cama o consulta ambulatoria
- nombre, apellido y matrícula del médico solicitante

2. Datos clínicos

- diagnóstico presuntivo
- comorbilidades
- estado inmunitario del paciente

3. Datos de la muestra

- Tipo o naturaleza del producto
- exacta localización de la toma
- procedimiento utilizado en la extracción de la muestra, o si se ha seguido alguna técnica especial (punción transtraqueal, vesical, etc.)
- fecha de la obtención (en algunos casos, se requiere consignar la hora)

4. Terapéutica del paciente

- antibióticos que se han administrado en las últimas 72 horas
- tiempo desde la última toma o inyección.

Idealmente las muestras se deben tomar antes de empezar el tratamiento ATB.

5. Tipos de estudios o determinaciones que se solicitan

- Cultivo para gérmenes comunes, tinción para BAAR, tinta china, gota fresca, y en caso de que se desee la búsqueda de un microorganismo determinado, se reseñará el nombre de éste, escrito de manera correcta según la nomenclatura vigente (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium* spp.), búsqueda de Dermatofitos, etc.

Datos del paciente		
Nombre y apellido:		
Edad:		
Paciente: ambulatorio/internado	Servicio/Sala.....	Cama.....
Recibió tratamiento antimicrobiano: si-no ¿Cuáles?.....		
Tiempo de tratamiento ATB		
Enfermedad/es de base:.....		
Diagnóstico presuntivo:.....		
Datos de la muestra		
Fecha obtención de la muestra:...../.../.....		
Material o muestra remitida:		Método de recolección.....
Estudio que solicita:		
Observación directa; examen en fresco, tinción de Gram, Tinta china, Ziehl-Neelsen, Giemsa, otra		
Cultivo para gérmenes comunes, Mycobacterias, Hongos		
Tipificación de gérmenes		
Antibiograma		
Otro		
Nombre del profesional solicitante		

Figura 3. Modelo de orden para solicitud de estudio microbiológico

Existen situaciones en que es conveniente tomar la muestra junto a la cama del enfermo, como en el caso de los hemocultivos y líquido cefalorraquídeo (LCR); en otras es preferible realizarla en el laboratorio y si no es posible, remitirla en forma inmediata, como en el caso de exudados genitales que requieren una observación en fresco al microscopio (*chancro sífilítico*, *Trichomonas vaginalis*) y siembra inmediata (*Chlamydia*, *Ureaplasma*). En otras situaciones, como en el caso de una muestra de tejidos profundos o biopsia, se debe tomar en el quirófano, durante el procedimiento quirúrgico efectuado.

El procedimiento de obtención de la muestra requiere una perfecta asepsia de la piel con alcohol o iodopovidona. La **antisepsia de la piel** es un paso fundamental, ya que **permite el arrastre mecánico y la eliminación de los gérmenes que son flora normal de la piel y de aquellos que transitoriamente pudieran colonizarla.**

Las muestras siempre deben ser extraídas con elementos de protección de barrera: guantes, barbijo, camisolín, protección ocular.

Todos los elementos utilizados para la recolección de muestras destinadas a estudios microbiológicos deben ser estériles: jeringas y agujas, recipientes de boca ancha, tubos, etc. (Figura 4).



Figura 4. Recipientes estériles para la recolección de muestras

La piel se debe limpiar en forma centrífuga, por lo menos 2 veces. El iodo debe estar no menos de un minuto sobre la piel. Si el paciente es alérgico o presenta sensibilidad al iodo, luego de punzar, limpiar la zona con alcohol.

La muestra debe tomarse en el sitio exacto de la lesión con las máximas condiciones de asepsia que eviten la contaminación con microorganismos exógenos. Es fundamental que la muestra nunca se ponga en contacto con antisépticos o desinfectantes (porque pueden provocar la lisis de los microorganismos), que la toma sea lo más precoz posible y que se prefieran siempre los fluidos purulentos frescos líquidos (recogidos por aspiración directa con jeringa) o tejidos sospechosos, a las muestras tomadas con hisopos o torundas con algodón. Se tomarán cantidades adecuadas de la muestra para facilitar su procesamiento.

Si se pretende investigar gérmenes anaerobios, obtener una columna de material en la jeringa sin aire o luego de eliminarlo y posteriormente pinchar la aguja con un tapón de goma. Mantener a temperatura ambiente el menor tiempo posible y remitir inmediatamente al laboratorio.

Todas las muestras deben recogerse antes de la instauración del tratamiento antibiótico. Cuando esto no es posible, se obtendrán justo antes de la administración de la dosis del antimicrobiano, o tras 48 horas de la retirada del mismo, indicándolo en la orden de estudio microbiológico.

Transporte de la muestra

Cualquier tipo de muestra debe ser considerada **potencialmente infectiva**, hasta que se demuestre lo contrario y **siempre se deben seguir las normas existentes para el transporte de productos biológicos**.

Todas las muestras deberán ser **enviadas lo más rápidamente posible al laboratorio**; idealmente, las muestras deben ser procesadas dentro de las dos primeras horas de su recolección. La mayoría de las bacterias resisten bien las temperaturas bajas, por lo que los productos pueden mantenerse en la heladera unas horas. Sin embargo, hay fluidos biológicos como el LCR (*N. meningitidis* es muy sensible al frío), sangre, que no deben ser refrigerados. En todos los casos, el envío de la muestra debe evitar la salida (y posible contaminación) del contenido, por lo que el recipiente debe de cerrarse con seguridad, utilizar un doble recipiente, o utilizar contenedores apropiados para el transporte de muestras biológicas (Figura 5). Siempre deberá aclararse el tipo de muestra que se envía, la identidad de la persona a quien pertenece dicha muestra y el Servicio o persona que solicita el estudio.

Cuando la viabilidad de las bacterias es muy escasa o la posibilidad de desecación de la muestra es grande (favoreciéndose la destrucción bacteriana) y la toma no puede realizarse en el mismo laboratorio, se usarán medios de transporte. Se trata de medios, tales como el de Stuart o Amies, que no son nutritivos, sino que preservan las bacterias existentes, sobre todo si son escasas, a la vez que impiden el crecimiento exagerado de otra flora bacteriana no deseada. Estos medios existentes en el comercio pueden ser para bacterias aerobias o anaerobias, y aunque pueden preservar la viabilidad bacteriana hasta 24 horas a temperatura ambiente, deberán enviarse al laboratorio lo más rápidamente posible.



Figura 5. Modelos de contenedores de transporte para muestras biológicas

TOMA DE LAS PRINCIPALES MUESTRAS CLÍNICAS PARA ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

SANGRE

El cultivo de la sangre para la detección de microorganismos se denomina **hemocultivo**. La detección de la bacteriemia y la fungemia constituye una de las prioridades del Servicio de Microbiología ya que se asocian con una elevada mortalidad (20 a 50%).

Se define como **bacteriemia** la presencia de bacterias en la sangre que se pone de manifiesto por el aislamiento de éstas en los hemocultivos. El término **fungemia** se utiliza para designar la presencia de hongos en la sangre. **Sepsis** es una expresión utilizada para denominar el síndrome clínico con el que habitualmente se manifiestan las bacteriemias o las fungemias, independientemente del resultado de los hemocultivos.

La bacteriemia y la fungemia son complicaciones graves de las infecciones bacterianas y fúngicas, respectivamente, y tienen una metodología diagnóstica muy similar por lo que se describirán de forma conjunta. Ambas se producen cuando los microorganismos invaden el torrente sanguíneo y se multiplican a un ritmo que supera la capacidad del sistema reticuloendotelial para eliminarlos. Esta invasión puede producirse desde un foco infeccioso extravascular, a través de los capilares sanguíneos o de los vasos linfáticos, o desde un foco intravascular (endocarditis, infección de catéteres intravenosos o arteriales).

Las bacteriemias pueden ser transitorias, continuas o intermitentes según la forma en que aparecen los microorganismos en la sangre, pero esta distinción es difícil de establecer y poco práctica desde el punto de vista microbiológico.

El término “**bacteriemia intratratamiento**” se emplea cuando ésta se presenta en un paciente que está recibiendo terapia sistémica con antimicrobianos a los cuales es sensible el microorganismo aislado. Su presencia puede ser debida a una concentración inadecuada del antimicrobiano en la sangre, a un incorrecto drenaje del foco de infección, a la presencia de endocarditis o infección endovascular, al deterioro de las defensas del huésped o al desarrollo de resistencia al antimicrobiano.

La incidencia de la bacteriemia depende del tipo de población estudiada (5-30 casos por 1.000 pacientes hospitalizados) y puede presentarse a cualquier edad, sobre todo en pacientes con graves enfermedades de base y en los sometidos a maniobras que alteran los mecanismos locales y generales de defensa frente a la infección. Los focos más frecuentes de bacteriemia son el tracto genitourinario, los abscesos, las heridas

quirúrgicas, la vía biliar y los catéteres intravasculares, aunque hasta en un 25% de los casos su foco originario es desconocido.

La mayoría de los microorganismos son capaces de invadir el torrente circulatorio. En la actualidad los cocos grampositivos, especialmente del género *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, igualan o superan en frecuencia a los microorganismos gramnegativos. Ello es debido a múltiples causas, entre las que destacan la utilización de antibióticos de amplio espectro, el uso generalizado de catéteres intravasculares, el empleo de métodos de diagnóstico invasores, y además, la gran avidez de estos gérmenes por la colonización del endotelio vascular. Por lo tanto, la presencia de cocos grampositivos pertenecientes a estos 3 géneros en 2 hemocultivos debe motivar la realización de estudios para descartar la infección endovascular (endocarditis u otros focos potenciales). Por otra parte, el aumento de pacientes inmunodeprimidos con tratamientos antineoplásicos o con infección por el VIH/SIDA ha propiciado la aparición de bacteriemias por agentes que en el pasado eran causa muy infrecuente de infección. El diagnóstico definitivo de la bacteriemia se establece cuando se aísla el microorganismo causal en la sangre del enfermo mediante el cultivo de ésta.

El aislamiento del agente responsable es trascendente para conocer su sensibilidad a los ATM e instaurar el tratamiento o las modificaciones necesarias a la terapia empírica ya establecida. En ocasiones puede orientar el diagnóstico de otras comorbilidades o enfermedades coexistentes, como la neoplasia de colon (asociada a bacteriemia por *Streptococcus bovis*), endocarditis (*Streptococcus* del grupo *viridans*), Diabetes mellitus (*Pseudomonas aeruginosa*) e incluso infección por el VIH (*Salmonella* spp., *Rhodococcus equi*).

INDICACIONES DE LOS HEMOCULTIVOS

De forma general, los cultivos deben realizarse,

- 1. Antes de la administración de la terapia antimicrobiana sistémica**
- 2. Siempre que exista sospecha clínica de sepsis, infecciones localizadas que puedan complicarse con bacteriemia:** meningitis, osteomielitis, pielonefritis, infección intraabdominal, artritis, infecciones graves de la piel y tejidos blandos, neumonía, endocarditis.
- 3. Ante el diagnóstico clínico de fiebre de origen desconocido** (absceso oculto, fiebre tifoidea, brucelosis, etc.)
- 4. Cuando el paciente tiene leucopenia, leucocitosis o trombocitopenia** no relacionado con procesos hematológicos

Los signos clínicos que nos orientan son la presencia de escalofríos, leucocitosis o granulocitopenia, deterioro uni o multiorgánico de etiología no aclarada, shock, compromiso hemodinámico de causa desconocida y combinaciones de algunos de ellos.

La extracción de hemocultivos está indicada, asimismo, en niños pequeños o ancianos con disminución súbita de la vitalidad, ya que en estas poblaciones pueden no presentarse los signos y síntomas típicos de la bacteriemia.

El cultivo de la sangre debe complementarse con el de otros fluidos biológicos, según la sospecha del foco clínico, como LCR, orina, muestras del tracto respiratorio inferior o líquido sinovial en pacientes con sospecha de meningitis, pielonefritis, neumonía o artritis séptica, respectivamente.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE

Cuando la muestra se obtiene adecuadamente la probabilidad de que el resultado de los hemocultivos positivos represente una bacteriemia verdadera, aumenta. **El momento óptimo para la extracción de hemocultivos es exactamente antes del inicio de los escalofríos.** Como este hecho es imposible de predecir con exactitud, se recomienda que la sangre para cultivo sea extraída **lo antes posible después del comienzo de la fiebre y los escalofríos**, o siempre que se sospeche una infección grave. No obstante, el momento de la extracción de la muestra de sangre es indiferente si la bacteriemia es continua, como en la endocarditis u otras infecciones intravasculares y en las primeras semanas de la fiebre tifoidea o la brucelosis.

No ocurre lo mismo en la bacteriemia intermitente, que se presenta en diferentes infecciones, y en la bacteriemia transitoria, generalmente autolimitada y benigna, que suele producirse después de manipulaciones en superficies mucosas no estériles (procedimientos dentales o urológicos, endoscopias), en tejidos infectados (abscesos, forúnculos, celulitis) o en cirugía de áreas contaminadas. En ambos casos, que constituyen la mayoría de las bacteriemias, la muestra de sangre debe extraerse lo más cerca posible del pico febril.

a. Venopunción

La muestra de sangre para hemocultivo debe extraerse de una vena, utilizándose generalmente las del antebrazo. La utilización de sangre arterial no ha demostrado ventajas sobre la venosa, aunque cuando no haya venas accesibles puede realizarse la extracción de sangre arterial. La extracción no debe realizarse a través de catéteres intravenosos o intaarteriales, salvo en los casos de sospecha de bacteriemia asociada a catéter. **Cada muestra de sangre se obtendrá de lugares de venopunción diferentes.**

b. Asepsia de la piel

El principal problema para la interpretación correcta de los hemocultivos es su contaminación con la microbiota cutánea durante la extracción. Para evitarla debe prepararse antes meticulosamente la piel de la zona de extracción. Después de la palpación de la vena elegida para la punción se limpiará la zona con alcohol isopropílico o etílico al 70% durante 30 segundos. Se aplicará a continuación una solución yodada (tintura de yodo al 1-2% durante 30 segundos o povidona yodada al 10% durante 1 minuto) cubriendo un área circular de 2-4 cm de diámetro. Es importante dejar secar el compuesto yodado para que ejerza su acción oxidante y evitar tocar con los dedos el lugar de la venopunción, así como hablar o toser mientras se realiza la extracción. Se recomienda el uso de barbijo para realizar el procedimiento para evitar la contaminación de los hemocultivos con la flora nasal o respiratoria del extraccionista. En pacientes alérgicos a los compuestos yodados se deben realizar dos limpiezas con alcohol isopropílico. Con una técnica aséptica correcta, el número de hemocultivos contaminados no debe exceder del 3%. En general, se consideran microorganismos contaminantes: *Staphylococcus* coagulasa negativa, *Bacillus* spp., *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp. y otros que forman parte de la microbiota de la piel, siempre que su presencia no se repita en más de una muestra por paciente. Por eso es fundamental la extracción del par de 2 hemocultivos como mínimo, dado que **los hemocultivos se consideran positivos cuando el mismo germen se aísla en las 2 muestras.**

c. Extracción de la muestra de sangre

Antes de proceder a la extracción se limpiarán los tapones de los frascos de hemocultivo con un antiséptico que se dejará secar para evitar su entrada en el interior del frasco al inocular la sangre. Se ha demostrado que la introducción de pequeñas cantidades de antiséptico en el frasco puede inhibir el crecimiento bacteriano. A continuación, se insertará la aguja en la vena elegida y se extraerá el volumen de sangre sin utilizar anticoagulante. No debe ponerse algodón u otro material no estéril sobre la aguja en el momento de sacarla de la vena. Los frascos de hemocultivo deben inocularse rápidamente para evitar la coagulación de la sangre en la jeringa, atravesándolos con la aguja en posición vertical. El cambio de agujas no disminuye la tasa de contaminación y aumenta el riesgo de pinchazo accidental. Se inoculará en primer lugar el frasco anaerobio, evitando la entrada de aire, seguido del aerobio, invirtiéndolos varias veces para mezclar la sangre y el medio de cultivo.

d. Número e intervalo de las extracciones

Se considera una extracción para hemocultivo a la sangre extraída de una única venopunción, independientemente de los frascos en los que sea inoculada,

habitualmente dos (aerobio y anaerobio). **El número de extracciones considerado óptimo para la documentación de un episodio de bacteriemia es de 2 a 3, utilizando siempre lugares diferentes de venopunción.** De esta manera logran detectarse más del 95% de las bacteriemias. Un mayor número de extracciones es desaconsejable desde el punto de vista coste/beneficio e incrementa innecesariamente el trabajo del laboratorio. No obstante, en los pacientes con sospecha de endocarditis sobre prótesis, donde puede ser difícil interpretar el aislamiento repetido de *Staphylococcus* coagulasa negativa, o en casos de endocarditis con hemocultivos inicialmente negativos que pueden ser debidos a microorganismos de difícil crecimiento, puede ser útil la disponibilidad de un número mayor de extracciones.

La extracción debe realizarse lo antes posible después de la aparición de los síntomas (fiebre, escalofríos) teniendo en cuenta que las bacterias son eliminadas rápidamente de la sangre por las células del sistema reticuloendotelial. Por esta misma razón **no se recomiendan extracciones separadas por periodos de tiempo concretos**, al contrario, un estudio ha demostrado que **se obtienen similares resultados cuando se extraen los hemocultivos simultáneamente** que cuando se extraen separados por periodos de tiempo arbitrarios durante 24 horas. Siempre que sea posible, **las extracciones deben realizarse antes de la administración de ATM.**

e. Volumen y dilución de la sangre

De todas las variables que influyen en el aislamiento de una bacteria u hongo en un hemocultivo, el volumen de sangre cultivada es la más importante debido al bajo número de microorganismos presentes en la mayoría de las bacteriemias.

La cantidad de sangre a introducir en cada frasco viene determinada por el modelo utilizado en cada hospital, entre **10-15 mL por toma en adultos y 1- 5 mL en neonatos y niños**. Como norma general es adecuado que la sangre mantenga una proporción 1:10 con el medio de cultivo. Es decir, para un frasco de 100 mL, introducir 10 mL. de sangre. En neonatos y niños, la bacteriemia de bajo nivel es muy frecuente, por lo que el volumen de sangre para detectarla debe ser proporcional al peso (al volumen de sangre total) y a la edad. Se recomienda cultivar un volumen de sangre aproximadamente del 4,5% del volumen total de sangre del paciente. La dilución de la sangre en el medio de cultivo es necesaria para neutralizar sus propiedades bactericidas. En los pacientes en tratamiento con antimicrobianos esta dilución permite, además, conseguir que la presencia de éstos se reduzca hasta alcanzar concentraciones subinhibitorias.

TRANSPORTE DE LA MUESTRA DE SANGRE AL LABORATORIO

Cada frasco de hemocultivo con la sangre inoculada debe ser debidamente identificado con los datos del paciente y **remitidos al laboratorio junto con la orden de solicitud de estudio microbiológico completa y con letra legible**. Si el paciente al que se le tomaron los hemocultivos es dado de alta, se registrará cómo contactarlo para informarle los resultados preliminares de los hemocultivos en caso de positividad.

Los frascos, con su debida identificación, deben transportarse al laboratorio inmediatamente. Sólo deben mantenerse a temperatura ambiente durante cortos periodos de tiempo para no afectar la posterior recuperación de los microorganismos. Si no pueden ser enviados inmediatamente al laboratorio se incubarán en una **estufa a 35-37°C** hasta ese momento (Figura 6). El tiempo máximo que pueden permanecer a temperatura ambiente antes de ser introducidos en el sistema, nunca debe superar las 18 horas. **Los hemocultivos nunca deben ser refrigerados.**



Figura 6. Estufa para cultivos microbiológicos

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE HEMOCULTIVOS

Un hemocultivo puede ser positivo sin que ello represente un episodio verdadero de bacteriemia. La principal causa de contaminación de hemocultivos es la presencia de microbiota del paciente o del personal de salud al extraer la sangre al realizar la extracción. Si la técnica de extracción, transporte y procesamiento es correcta, no debe contaminarse más de un 3% de todas las extracciones.

Denominamos “bacteriemia verdadera” a aquella producida por microorganismos realmente presentes en la sangre de los pacientes y falsas bacteriemias a las causadas por una contaminación accidental del hemocultivo durante su recolección. La distinción

entre la verdadera bacteriemia y la que no lo es constituye un asunto de la máxima importancia y trascendencia para el paciente.

Uno de los datos orientativos más importante lo constituye la **propia identidad de los microorganismos aislados**. Microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y otras enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* son responsables de bacteriemias verdaderas en más del 90% de los casos. Por el contrario, **es dudoso el papel que representan los microorganismos que forman parte de la microbiota del paciente** como *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Streptococcus* del grupo *viridans*, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* spp. y algunas especies de *Clostridium* que, en conjunto, suponen menos del 5% de las bacteriemias verdaderas. Sin embargo, algunos de estos microorganismos pueden ser responsables de auténticas bacteriemias en algunas situaciones y por tanto, su identidad no es un dato suficiente para establecer el criterio de significación clínica.

Es preciso recurrir al número de hemocultivos en que se repite el aislado y en este sentido, sin que el dato sea definitivo, es indudable que **la repetición de la misma bacteria en más de una extracción (suponiendo que todas las extracciones no se han realizado desde una misma vía contaminada)**, indica generalmente que se trata de una bacteriemia verdadera. Por el contrario, la presencia de un solo hemocultivo positivo de extracciones seriadas en un corto período de tiempo sugiere una contaminación.

En la mayoría de las ocasiones, sin embargo, el laboratorio no dispone de elementos suficientes para establecer con seguridad la significación de la bacteriemia. El microbiólogo debe compartir la información que posee con el clínico responsable del paciente para, junto con los datos clínicos de éste, valorar conjuntamente los resultados obtenidos.

PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE LOS HEMOCULTIVOS

A. Material necesario

- Frascos de hemocultivo (Figura 7).
- Lazo de goma.
- Jeringas y agujas de punción intravenosa.
- Gasas estériles.
- Guantes de látex estériles, barbijo y antiparras (recomendadas para evitar un posible contacto ocular por salpicadura)
- Alcohol etílico o isopropílico al 70%.
- Solución iodada.



Figura 7. Frascos de hemocultivo (método automatizado)

B. Pasos para la obtención de la muestra

1. Lavado antiséptico de las manos.
2. Retirar los tapones externos de los frascos.
3. Desinfectar los tapones de goma con alcohol iodado o con iodóforo, dejándolo secar 1 minuto.
4. Colocar el lazo de goma en el brazo del paciente.
5. Localizar por palpación la vena que se va a puncionar. Debe utilizarse una vena distinta para cada extracción.
6. Desinfectar con alcohol al 70% una zona de piel de unos 10 cm de diámetro. Se comenzará por el centro y se irán haciendo círculos concéntricos hacia el exterior, dejando actuar 30 segundos.
7. Repetir el paso anterior, pero con una solución iodada (tintura de yodo al 1-2%) dejando actuar durante 30 segundos, o povidona iodada al 10% durante 1 minuto.
8. Colocarse los guantes estériles
9. Extraer la sangre sin tocar en ningún momento el campo desinfectado.
10. Introducir la sangre en los frascos evitando que entre aire en el frasco para cultivo en anaerobiosis. Mover los frascos para que la sangre y el medio de cultivo se mezclen.
11. Introducir los frascos en estufa a 37°C.

ORINA

1. Orina obtenida por la técnica del chorro medio

Condiciones previas:

La primera orina de la mañana es la muestra más significativa porque contiene el mayor número de bacterias infectantes debido a la inactividad miccional del paciente durante la noche. Si esto no es posible, el paciente deberá tener como mínimo tres horas de retención. Se debe limitar la ingesta excesiva de líquido y suprimir antes toda medicación diurética. No debe administrarse antibióticos 72 hs antes de la recolección. En general, se recomienda obtener un volumen de 5 a 10 mL de orina.

Material necesario:

- Gasas estériles
- Jabón neutro
- Recipiente de boca ancha, con tapa a rosca, hermético y estéril

Recolección:

Técnica para mujeres

- a) Se lavará las manos cuidadosamente con agua y jabón, las enjuagará con agua y las secará con una toalla limpia.
- b) Limpiar la zona genitourinaria, tomando una gasa enjabonada y procediendo al lavado de la vulva, pasándola de delante hacia atrás y repitiendo el proceso un total de 4 veces.
- c) Inmediatamente enjuagar la región con abundante agua hervida y enfriada, o solución fisiológica estéril. No usar jabones desinfectantes.
- d) En las mujeres adultas, colocar un tapón vaginal, para evitar la contaminación con la flora de vagina. Se separarán los labios mayores y menores, y los mantendrá separados en todo momento hasta que se haya recogido la orina.
- e) Se indicará a la paciente que orine desechando los 20-25 primeros mL, tras lo cual y sin interrumpir la micción, se recogerá el resto de la micción (chorro medio) en un frasco estéril, rotulado, de boca ancha.
- f) El frasco debe sujetarse para que no tome contacto con pierna, vulva o ropa del paciente. Los dedos no deben tocar el borde del frasco o su superficie interior.

Técnica para hombres

- a) Lavado de las manos con agua y jabón.
- b) Lavar el prepucio

- c) Retraer completamente el prepucio, que se mantendrá así en todo momento, hasta que se haya recogido la orina.
- d) Limpiar el glande con jabón neutro.
- e) Eliminar los restos de jabón enjuagándolo con agua hervida y enfriada.
- f) Se pedirá al paciente que orine desechando los primeros 20-25 mL para, sin interrumpir la micción, recogerse el resto de la orina en el recipiente estéril.

Técnica para niños

- a) En niños y niñas mayores la orina se recoge de forma similar a los adultos.
- b) En niños y niñas más pequeños, la orina se puede recoger al acecho, en frasco estéril o en colectores estériles especialmente diseñadas para ellos (figura 8), de la siguiente forma:
 - Lavado cuidadoso de los genitales y área perineal igual que en los adultos.
 - Colocar la bolsa de plástico o el colector.
 - Vigilar la bolsa cada 30 minutos y tan pronto como el niño haya orinado, deben retirarse y enviarse al laboratorio para su procesamiento.
 - Si la micción no se ha realizado en una hora, se repite la operación colocando una nueva bolsa.

Transporte y conservación:

La orina recolectada debe llegar al laboratorio en un plazo máximo de 1 hora; si esto no es posible, debe ser refrigerada en la heladera (4-8° C) hasta el momento de su remisión al laboratorio. Si la muestra debe transportarse a distancia, puede disponerse en un recipiente de material aislante con hielo. La muestra puede permanecer hasta 48 hs en refrigeración, antes de procesarse. Bajo ningún concepto se procesarán puntas de sonda vesical por dar resultados contradictorios.

Observaciones:

En los niños sin control de esfínteres, la muestra también puede tomarse al acecho, previa higiene de la zona, como se indicó antes, en un frasco estéril. **Debido a la elevada contaminación de la orina con microbiota de piel o de las heces, la recolección de orina en bolsa colectora está desaconsejada.**

2. Orina obtenida por punción suprapúbica o punción vesical

Es la orina obtenida por punción suprapúbica o por citoscopía. La punción suprapúbica requiere un buen conocimiento de la técnica y de las precauciones que hay que adoptar. Con rigurosa asepsia, descartando problemas de hemostasia y con la vejiga palpable y

previa desinfección y anestesia local, se punciona ésta a 1,5 cm de la sínfisis pubiana, en la línea media. Estando el paciente en decúbito supino, con una jeringa de 10 mL y con una aguja larga (calibre 19) se aspira el contenido vesical (Figura 9).

En caso de orina obtenida por punción suprapúbica se enviará al laboratorio lo antes posible en la misma jeringa de la extracción, tras expulsar el aire de su interior y con la aguja pinchada en un tapón de goma estéril, indicando en volante adjunto, procedencia de la muestra o técnica empleada para su recogida (dato importante a la hora de valorar el recuento de colonias). Está indicada en pacientes con sospecha de infección urinaria por anaerobios, en recién nacidos, en pacientes que no controlan esfínteres o en pacientes con evidencia de infección urinaria, pero cuyos recuentos en el urocultivo por la técnica del chorro medio o por punción de sonda son bajos y de dudosa interpretación.



Figura 8. Colector pediátrico de orina

3. Orina obtenida por punción suprapúbica o punción vesical

Es la orina obtenida por punción suprapúbica o por citoscopia. La punción suprapúbica requiere un buen conocimiento de la técnica y de las precauciones que hay que adoptar. Con rigurosa asepsia, descartando problemas de hemostasia y con la vejiga palpable y previa desinfección y anestesia local, se punciona ésta a 1,5 cm de la sínfisis pubiana, en la línea media. Estando el paciente en decúbito supino, con una jeringa de 10 mL y con una aguja larga (calibre 19) se aspira el contenido vesical (Figura 9).

En caso de orina obtenida por punción suprapúbica se enviará al laboratorio lo antes posible en la misma jeringa de la extracción, tras expulsar el aire de su interior y con la aguja pinchada en un tapón de goma estéril, indicando en volante adjunto, procedencia

de la muestra o técnica empleada para su recogida (dato importante a la hora de valorar el recuento de colonias). Está indicada en pacientes con sospecha de infección urinaria por anaerobios, en recién nacidos, en pacientes que no controlan esfínteres o en pacientes con evidencia de infección urinaria, pero cuyos recuentos en el urocultivo por la técnica del chorro medio o por punción de sonda son bajos y de dudosa interpretación.

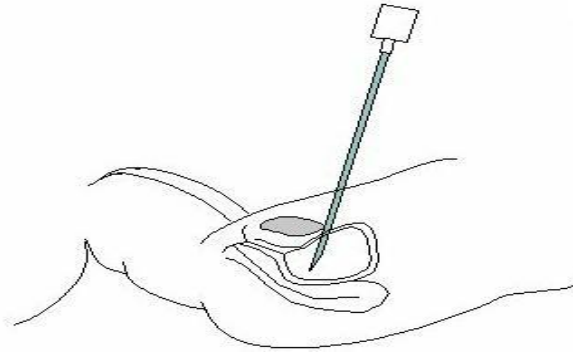


Figura 9. Punción suprapúbica o vesical

4. Orina obtenida por punción de sonda vesical

Material necesario:

- Gasas estériles
- Alcohol al 70% o solución iodada.
- Jeringa o aguja estéril
- Recipiente estéril

Procedimiento para obtener la muestra por punción de sonda vesical:

- Previo a la toma de muestra, se debe cambiar la sonda por una nueva estéril.
- Clampear (cerrar) la sonda en su extremo distal y esperar a que se llene de orina.
- Hacer una perfecta decontaminación (con alcohol o iodo povidona) de la zona externa de la sonda, luego punzar con jeringa y aguja estéril y aspirar entre 5 -10 mL, colocar la orina en frasco estéril y remitir inmediatamente al laboratorio (Figura 10).

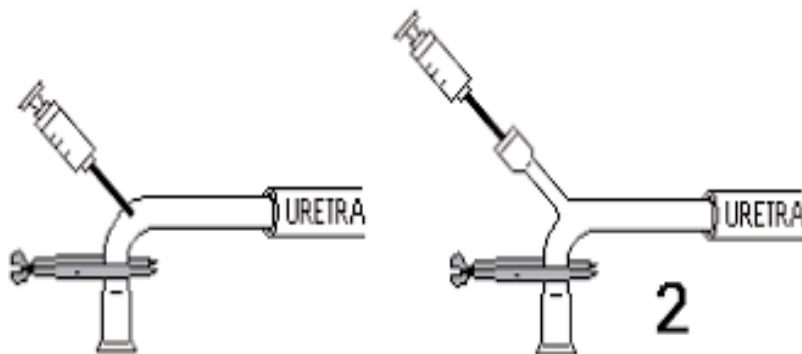


Figura 10. Clampeo y punción de sonda vesical para obtención de muestra de orina.

Se considera significativo de infección urinaria, el recuento mayor a 10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro de orina (100.000 UFC/mL), de una sola especie bacteriana. Recuentos iguales o menores a 10^4 UFC/mL (10.000), o el hallazgo de dos o más especies bacterianas diferentes, deben considerarse como muestras contaminadas. En este caso se requiere nueva muestra de orina.

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

La obtención de líquido cefalorraquídeo (LCR) se realiza ante la sospecha de meningitis y **siempre antes de instaurar cualquier terapéutica antibiótica**.

Debe realizarse en el quirófano y el profesional que tomará la muestra debe vestirse con camisolín y guantes estériles, cofia, barbijo y antiparras, ya que el riesgo de salpicaduras al realizar la punción es muy elevado, debido a que puede haber presencia de hipertensión endocraneana.

La recolección del material debe realizarla el médico, mediante la punción lumbar del 4° o 5° espacio intervertebral (Figura 11), con cuidadosa técnica aséptica y realizando la descontaminación y **antisepsia de la piel en forma centrífuga y en 3 tiempos**.

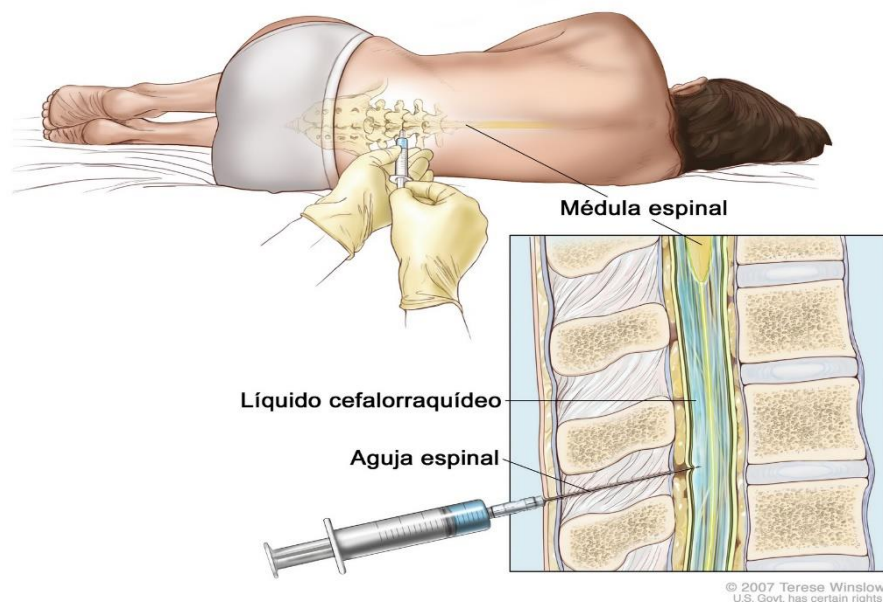


Figura 11. Punción lumbar para obtención de líquido cefalorraquídeo

La muestra se recolectará en 2 tubos estériles, uno destinado al examen fisicoquímico y otro para el estudio microbiológico. Puede extraerse material para un 3er tubo, en el caso que se requieran estudios adicionales, como por ejemplo, estudio virológico,

molecular o anatomopatológico. Se deben remitir aproximadamente 1,5 mL en cada tubo (Figura 12).

Las muestras deben enviarse de inmediato al laboratorio, donde serán procesadas en el momento o, en su defecto, mantenidas a 37° C, durante el menor tiempo posible.

NUNCA REFRIGERAR LA MUESTRA PARA ESTUDIO BACTERIOLÓGICO, pues se puede afectar la viabilidad de *N. meningitidis* y *H. influenzae*. Las muestras de LCR destinadas a otros estudios que no serán procesadas inmediatamente, pueden refrigerarse.



Figura 12. Tubos estériles para recolección de líquido cefalorraquídeo

SECRECIÓN DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR

▪ ESPUTO

Debe recolectarse la primera expectoración de la mañana porque contiene mayor cantidad de gérmenes patógenos debido a que el paciente, generalmente, no expectora durante la noche. La muestra se debe tomar en ayunas, previo cepillado de dientes y gargarismos con agua oxigenada de 10 volúmenes diluida (una cucharada en medio vaso de agua) o solución de bicarbonato de sodio (una cucharadita en medio vaso de agua).

Tomar la muestra en frasco estéril de boca ancha (figura 13), luego de toser 2 ó 3 veces para favorecer la expectoración, que debe ser lo más profunda posible. Si la muestra es escasa pueden hacerse nebulizaciones con solución fisiológica estéril (15 mL durante 10 minutos). El volumen adecuado de la muestra es de 2 a 10 mL.

Para la realización de la baciloscopía para gérmenes ácido alcohol resistentes (BAAR) y cultivo, que se utiliza para el diagnóstico de tuberculosis, deben remitirse no menos de 2 muestras de esputo, especificando que se desea realizar la tinción de Ziehl Neelsen

y eventualmente el cultivo para micobacterias, ya que, si no se aclara, el bacteriólogo solo hará tinción de Gram y cultivo para gérmenes comunes.

La muestra de esputo deberá ser enviada inmediatamente al laboratorio (antes de las dos horas de colectada). Si no es posible, conservarla en heladera a 4°C.



Figura 13. Frascos para recolección de esputo

▪ **ASPIRADO TRAQUEOBRONQUIAL SIMPLE**

Se obtiene mediante una sonda de aspiración y la muestra se recolecta en un tubo estéril. Se utiliza en niños que no expectoran. De valor análogo al esputo por su contaminación con la flora orofaríngea.

▪ **LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL)**

Consiste en la instilación y aspiración secuencial de solución fisiológica estéril a través del broncoscopio, el cual se encuentra enclavado en un subsegmento pulmonar (Figura 14).

El líquido para el lavado se instila en alícuotas de 20 a 50 mL con una jeringa. Cada instilación se sigue inmediatamente de una aspiración manual mediante la propia jeringa o bien con aspiración mecánica suave (con una presión de 5 cm. de agua), modificable en cada enfermo para conseguir la máxima cantidad de fluido instilado sin que colapse excesivamente la vía aérea y provoque su fusión hemorrágica submucosa. El líquido recuperado (alrededor de un 40-50% del volumen instilado) suele ser traslúcido u opalescente dependiendo de la cantidad de material celular y no celular en suspensión. En los casos de hemorragia alveolar difusa, es típico el aspecto rosado o marronáceo, más intenso en las últimas alícuotas recuperadas. En pacientes pediátricos, el volumen final no supera los 10 mL (miniBAL). La primera alícuota obtenida se considera representativa de la celularidad de vía aérea (muestra bronquial) y debe separarse del resto de alícuotas (muestra alveolar). La segunda o tercera porción son las ideales para

realizar cultivos cuantitativos. Debe remitirse una porción al laboratorio de anatomía patológica para estudios histopatológicos. El fluido debe verse en frascos de plástico o vidrio siliconado para retardar la adherencia de las células a la pared y ha de ser mantenido a 4° C hasta su estudio, el cual no debe diferirse más de dos horas. Si se requiere el transporte de las muestras a otro centro y por tanto se va a demorar su estudio, es útil resuspender la muestra obtenida en tubos de 50 mL con solución buffer salina (solución de Hanks) y enviar en heladera con refrigerante. Las variaciones en la técnica de obtención de muestras radican fundamentalmente en el volumen total instilado, que depende de la tolerancia del paciente y de la diversidad de estudios que se pretenda realizar.

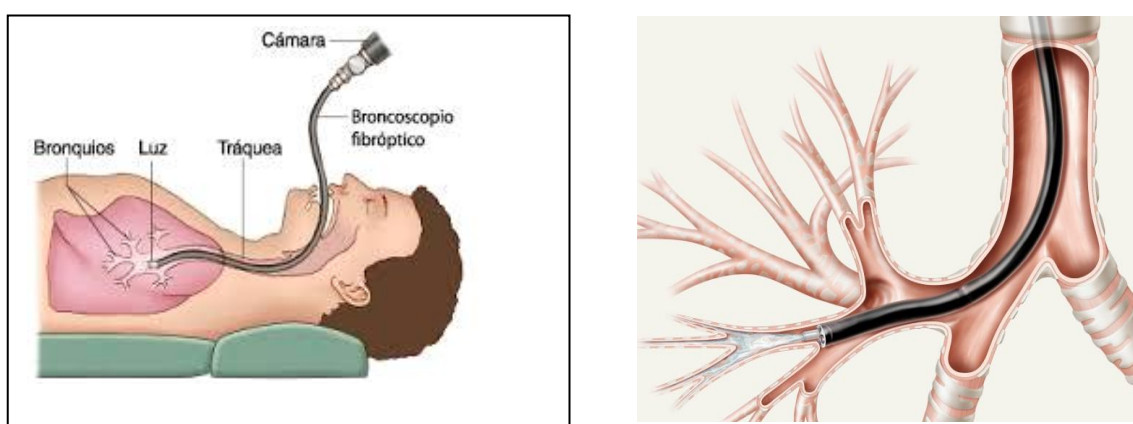


Figura 14. Lavado bronquioalveolar

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE MUESTRAS RESPIRATORIAS OBTENIDAS POR BAL

El examen directo de la muestra debe tener un **porcentaje de células epiteliales escamosas <1%**, contando por lo menos **200-300 elementos** entre macrófagos, células epiteliales escamosas y neutrófilos; **si este porcentaje se supera se estaría en presencia de una muestra contaminada con secreciones respiratorias de vías superiores**, por lo tanto, si bien se puede utilizar para diagnóstico de tuberculosis y micosis sistémicas, sería de pobre utilidad para el cultivo cuantitativo bacteriano. La presencia de células ciliadas bronquiales podría también ser tomada de acuerdo con algunos autores como otro marcador de contaminación. La observación de macrófagos es normal; si los mismos no se visualizan, en ausencia de neutrófilos, indicaría que es una muestra muy diluida o con bajo contenido de secreciones respiratorias. Los neutrófilos constituyen la respuesta del huésped a la infección; el hecho de no observarlos hace que la neumonía sea un proceso improbable en ese momento (en

pacientes no neutropénicos) o por lo menos en el lugar donde se tomó la muestra. Por otra parte, la presencia de éstos no es específica de neumonía, puesto que como se mencionó anteriormente, podrían existir otras múltiples causas que expliquen su presencia. También es de utilidad evidenciar la presencia de **bacterias intracelulares** puesto que tienen una elevada correlación con infección, aunque no está claro cuál es el porcentaje de células fagocíticas con bacterias intracelulares que indican esta condición (rango 2-25%). Debemos recordar sin embargo que las bacterias capsuladas (Ej.: *S. pneumoniae*) son habitualmente extracelulares.

Para el diagnóstico de infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior, se realiza una tinción de Gram y un cultivo cuantitativo del líquido del BAL. Los aislamientos de 10.000 unidades formadoras de colonias por mililitro (10^4 ufc/mL) de un solo germen, se valoran como significativos. La presencia de 2 o más tipos de microorganismos, sugiere contaminación de la muestra.

Por otra parte, el hallazgo de bacterias intracelulares es muy indicativo de infección pulmonar. El porcentaje significativo de células con bacterias intracelulares oscila entre el 2 y el 10% según distintas experiencias (algunos autores consideran que porcentajes superiores al 2% son diagnósticos de infección pulmonar).

Con el objetivo de obtener un fluido alveolar con menor riesgo de contaminación por las secreciones de las vías aéreas superiores existe la técnica de lavado broncoalveolar protegido (BAL-P). Este consiste en la instilación y la aspiración subsiguiente a través de un catéter especial provisto de un tapón distal reabsorbible. Es de gran utilidad en la enfermedad infecciosa. La interpretación de la muestra de BAL se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Muestra representativa de lavado bronquioalveolar

Muestra representativa del BAL	
<i>Células epiteliales escamosas</i>	<i><1%</i>
<i>Celularidad</i>	<i>Hasta 300 elementos</i>
<i>Cultivo cuantitativo</i>	<i>10^4 ufc/mL</i>

JUGO GASTRICO

En niños pequeños o en pacientes que no expectoran y tragan sus esputos, puede realizarse una **aspiración gástrica** tras un periodo de ayuno de 8 horas. Se suele utilizar cuando la muestra presenta un número muy pequeño de microorganismos especialmente resistentes al pH gástrico, como las micobacterias.

EXUDADO DE FAUCES

Para realizar el hisopado de las fauces, se debe utilizar un hisopo estéril con medio de transporte adecuado (Figura 15). Se debe indicar al paciente que abra la boca, saque la lengua, con ayuda de un bajalenguas estéril y con buena iluminación queda expuesto el istmo de las fauces. En estas condiciones se frotarán con el hisopo estéril las fauces, amígdalas y toda área donde se observe inflamación, ulceración, exudación o pseudomembranas. No se debe tocar con el hisopo la lengua, carrillos, labios o saliva. No es conveniente utilizar hisopo de algodón, pues inhibe el crecimiento de *B. pertussis*) El hisopo se coloca en medio de transporte. La muestra puede permanecer a temperatura ambiente por 24 horas.



Figura 15. Hisopo estéril con medio de transporte

SECRECIÓN O EXUDADO NASOFARÍNGEO

Esta muestra se toma para aislar *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae* (agente de la difteria) y *Neisseria meningitidis*.

Se coloca un espéculo nasal o cánula para introducir un hisopo estéril humedecido en solución fisiológica estéril. Se frota nasofaringe y se coloca en medio de transporte. La muestra debe mantenerse a temperatura ambiente hasta su envío inmediato al laboratorio.

SECRECIÓN DE FOSAS NAALES

En estas muestras se buscan portadores de *Staphylococcus aureus* o de *Streptococcus* spp. Se introduce un hisopo estéril humedecido en solución fisiológica estéril unos 2 cm en la fosa nasal, se rota suavemente y se coloca en el medio de transporte; hasta su procesamiento, la muestra puede dejarse a temperatura ambiente no más de 24 horas.

HERIDAS SUPERFICIALES Y PROFUNDAS

Las heridas superficiales de úlcera de decúbito, de úlceras de miembros inferiores, etc., suelen estar contaminadas con gérmenes de la piel y/o gérmenes ambientales que nada tienen que ver con la etiología del proceso infeccioso, por eso es imprescindible higienizar para decontaminar la superficie y márgenes de la herida con abundante, solución fisiológica estéril por arrastre y con la ayuda de gasa estéril. Tomar la muestra con jeringa y aguja estéril de la zona más profunda de la herida. La toma de la muestra con hisopo estéril debe reservarse para cuando no es posible realizar la punción-aspiración para obtener material de la herida; en estos casos, el hisopado deberá realizarse en el fondo de la herida. Remitir la jeringa o el hisopo al laboratorio. La muestra proveniente de heridas superficiales debe colocar en la heladera; la que proviene de heridas profundas debe dejarse a temperatura ambiente. Si se buscan microorganismos anaerobios, la muestra de elección es por punción-aspiración con jeringa.

EXUDADO URETRAL

Se debe recolectar el primer exudado matinal sin que el paciente haya orinado previamente. Se limpia la zona prepucial con gasa estéril humedecida en solución fisiológica estéril. Se introduce en el meato urinario un hisopo estéril, luego se coloca en medio de transporte (Figura 16). Cuando la secreción es escasa o no perceptible se tomará el primer chorro miccional. Previa higiene externa debe recoger en frasco estéril el primer chorro de orina (10 mL aproximadamente) y desechar el resto.

El medio ácido de la orina suele inhibir el crecimiento de microorganismos, por lo tanto, el primer chorro miccional sólo se recomienda para la búsqueda de antígenos de *Chlamydia trachomatis*. Estas muestras no se refrigeran y deben remitirse al laboratorio en forma inmediata.

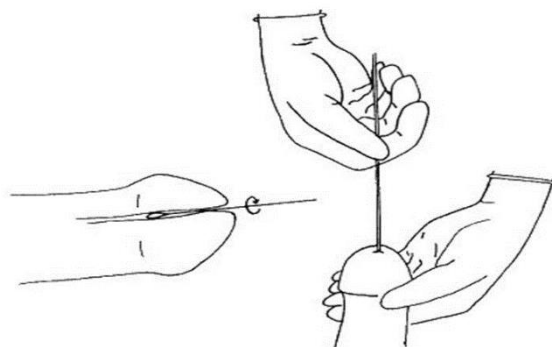


Figura 16. Toma de muestra de exudado uretral

EXUDADO O FLUJO VAGINAL

Para la toma de muestras de exudado o flujo vaginal destinadas a estudios microbiológicos, se procede de la siguiente forma:

1. se coloca a la paciente en posición ginecológica.
2. se coloca el espéculo sin lubricantes ni desinfectantes, a lo sumo humedecido con agua tibia.
3. una vez visualizado el endocervix se toman dos muestras con hisopos estériles: una de fondo de saco vaginal y otra de endocervix, previa extracción del tapón mucoso con una gasa y pinza ginecológica estériles (Figura 17).

Ambas muestras se colocan en el medio de transporte adecuado y se envían al laboratorio a la mayor brevedad posible, donde se procesarán inmediatamente. No se refrigeran.

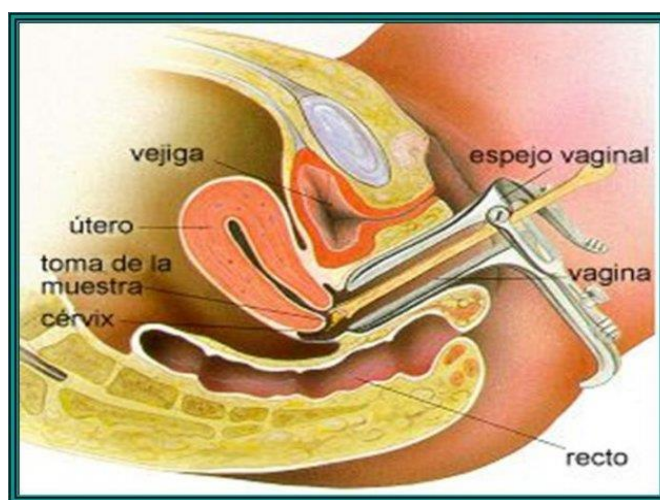


Figura 17. Toma de muestras ginecológicas

HECES

Condiciones previas:

Las muestras de heces para coprocultivo deberán tomarse antes de la administración de antimicrobianos o agentes antidiarreicos. Es conveniente también evitar la utilización previa de antiácidos y laxantes oleosos, así como de los compuestos habitualmente utilizados para estudios radiológicos digestivos (bario, bismuto). Para la realización de estudios parasitológicos debe realizarse además una dieta sin residuos los días previos a la toma de las muestras.

Material necesario:

- Recipiente de boca ancha para recoger las heces, tipo bacha o bacinilla. No es necesario que esté estéril, sólo es preciso que esté limpio y que no contenga restos de jabones, detergentes, desinfectantes o iones metálicos.
- Recipiente estéril de boca ancha y cierre hermético para enviar la muestra. Puede ser válido el empleado para recoger orinas, aunque es preferible utilizar un recipiente que tenga espátula para tomar la muestra de las heces (Figura 18).
- Medios o sistemas de transporte para heces. Se emplean sólo si la remisión de la muestra se retrasa y los distribuye el laboratorio de Microbiología. Existen sistemas comerciales para bacterias (Cary Blair) o para parásitos.
- Espátula o cucharilla.



Figura 18. Recipientes para toma de muestra de materia fecal

Obtención de la muestra:

- Si son formadas o pastosas se toma una porción del recipiente donde hayan sido emitidas y se transfieren al sistema elegido para el envío al laboratorio. Se seleccionan zonas donde haya sangre, moco o pus.
- No son válidas las muestras contaminadas con orina. No debe utilizarse para la recogida papel higiénico, porque suelen tener sales de bario que inhiben algunas bacterias enteropatógenas.

Para el estudio bacteriológico es suficiente enviar la muestra en un recipiente estéril si se va a procesar en el plazo de 1 ó 2 horas después de su emisión. En caso contrario se remite en un sistema de transporte para bacterias. En ambos casos se mantiene en refrigeración hasta el procesamiento, para evitar el sobrecrecimiento de la flora normal que puede enmascarar o destruir a los enteropatógenos.

Para el estudio de toxinas de *Clostridium difficile*, la muestra se puede mantener hasta 48 horas en refrigeración y si se congela a -20°C se puede mantener indefinidamente. Las muestras para estudio virológico deben enviarse sin medio de cultivo, pues este diluye las partículas virales disminuyendo la sensibilidad del estudio a realizar. Si su envío se retrasa por más de 24 hs es necesario utilizar un medio de transporte.

3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

Una vez que el material clínico llega al laboratorio comienza el trabajo del microbiólogo en la investigación del agente etiológico. En el proceso de recepción de las muestras, se deben comprobar una serie de aspectos que permitan determinar si la muestra cumple los requisitos de calidad necesarios para ser procesada. De no ser así, los resultados de los estudios microbiológicos realizados pueden verse afectados negativamente, lo que puede conllevar a la no detección del agente etiológico o a la detección de microorganismos contaminantes, es decir, que no sean los responsables de la enfermedad, lo que podría conllevar a la instauración de tratamientos inadecuados o innecesarios.

El primer paso en el procesamiento de las muestras clínicas es el **examen directo**.

3.1. EXAMEN DIRECTO

Consiste en la observación macroscópica y microscópica de los materiales clínicos remitidos. Al microscopio se observa la calidad de la muestra recolectada, la presencia o ausencia de bacterias, la cantidad y diversidad bacteriana, la presencia de células inflamatorias, leucocitos, hematíes, mucus o cristales, según la muestra obtenida (Figura 19)

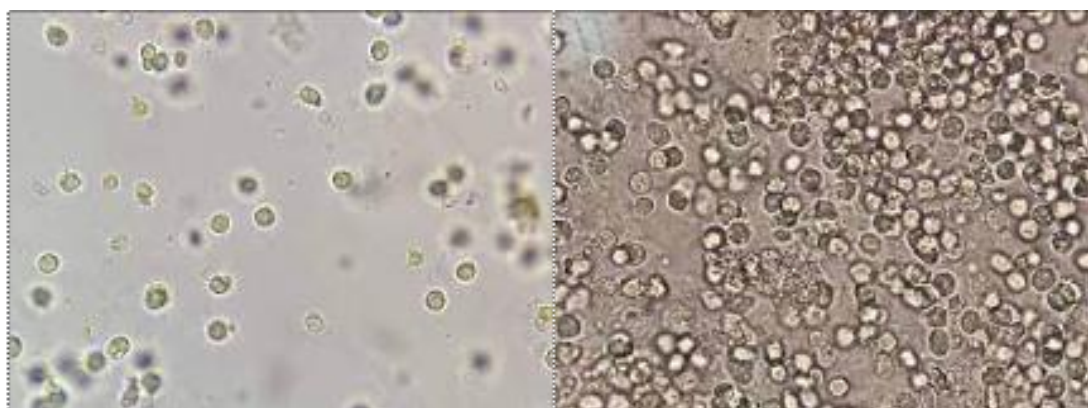


Figura 19. Observación microscópica de un sedimento urinario: hematíes (izquierda) y leucocitos (derecha)

La observación de bacterias en las muestras se realiza por dos métodos:

a- En fresco: esta observación permite observar la morfología, movilidad y otras características de los microorganismos. Un ejemplo del uso de esta técnica es el aplicado a la búsqueda del *Treponema pallidum*, agente de la sífilis, en una muestra tomada de chancro sifilítico (Figura 20)



Figura 20. Observación de espiroquetas en microscopio de campo oscuro

b- Por coloraciones: aunque las tinciones poseen una sensibilidad intermedia, una tinción positiva es una confirmación rápida de la presencia de microorganismos en la muestra biológica. Las bacterias son detectadas comúnmente por medio de tinciones que utilizan colorantes diferenciales y fluorescentes. Dentro de las que utilizan colorantes diferenciales, la **tinción de Gram** es una tinción sencilla, fiable, que puede proporcionar una información preliminar importante, en relación con la etiología bacteriana de una infección. Nos puede informar si es causada por un microorganismo gram negativo o gram positivo y si el microorganismo es un bacilo o un coco.

Un microscopista experimentado puede clasificar aún mejor los microorganismos en base a diferencias sutiles en la morfología o disposiciones espaciales. Por ejemplo, los estafilococos (*Staphylococcus*) son cocos gram positivos dispuestos en racimos (Figura 21); los estreptococos son cocos gram positivos dispuestos en cadenas; *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus* son cocos gram positivos dispuestos en diplos; las enterobacterias son bacilos gram negativos que se tiñen más intensamente en los extremos que en el centro.

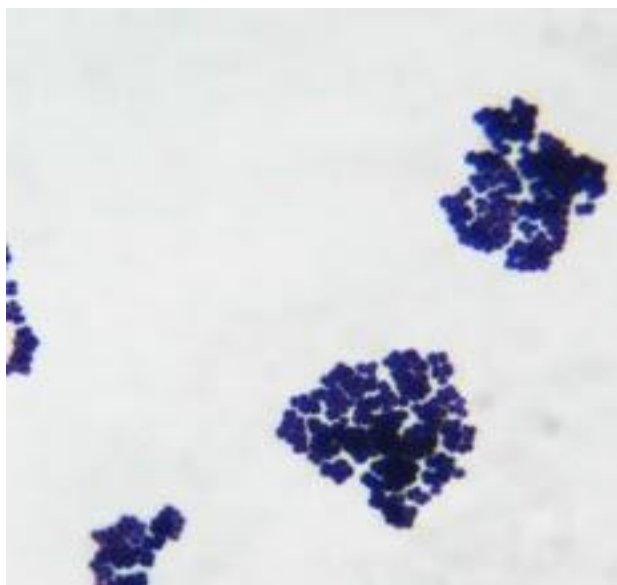


Figura 21. Cocos gram positivos agrupados en racimos

Para detectar bacterias con ácidos micólicos de cadena media y de cadena larga en la pared bacteriana se utiliza la **tinción de ácido-alcohol resistencia (Ziehl Neelsen)**. Una de sus principales utilidades es la detección de *Mycobacterium* (bacilos ácido-alcohol resistentes o BAAR) en muestras de esputo (Figura 22). También se utiliza para la detección de algunos parásitos.

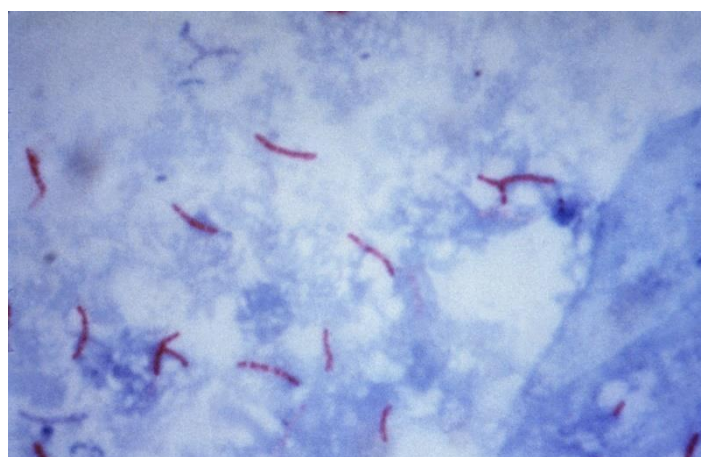


Figura 22. Bacilos ácido-alcohol resistentes

La coloración de **Giemsa** es una tinción diferencial utilizada principalmente para detectar ciertas bacterias, como *Borrelia* spp.

Las tinciones fluorescentes son generalmente las tinciones microscópicas más sensibles porque las bacterias teñidas con colorantes fluorescentes se detectan con facilidad sobre un fondo negro. Se emplean los colorantes de auramina y rodamina en vez de la tinción de ácido-alcohol resistencia para detectar micobacterias. Esta tinción

es más sensible que las tinciones tradicionales de ácido-alcohol resistencia y tiene la misma especificidad. Se utiliza la tinción de naranja de acridina para detectar bacterias en hemocultivos positivos cuando la tinción de Gram es negativa y cuando ciertos microorganismos finos son difíciles de detectar con la tinción de Gram (p. ej., *Campylobacter*, *Helicobacter*).

Coloración de Gram

La coloración de Gram es una tinción diferencial que permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: gram positivas y gram negativas. Es un procedimiento sencillo, rápido, ya que insume aproximadamente 30 minutos y es de gran utilidad para el médico y el profesional de laboratorio (Figura 23).

La pared de las bacterias gram negativas tiene un contenido lipídico más elevado que la de las gram positivas y aunque en ambas se forma el complejo colorante-iodo, el alcohol extrae el lípido de las gram negativas y aumenta la permeabilidad celular con la pérdida del complejo mencionado, por lo tanto, se colorearán con el segundo colorante, de color rosa o fucsia. En cambio, en las gram positivas la pared presenta una barrera a la solución del complejo colorante-iodo, por lo tanto, éste no se pierde porque la deshidratación por alcohol-acetona ocasiona una disminución de la permeabilidad y quedan coloreadas de violeta.

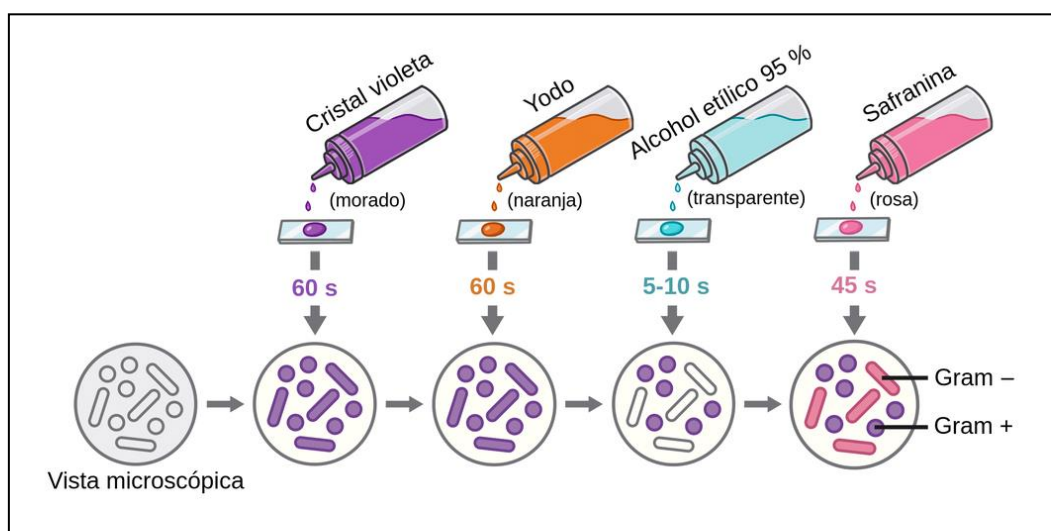


Figura 23. Esquema de la secuencia de preparación de la coloración de Gram

La ausencia de visualización de gérmenes en una muestra clínica no excluye la posibilidad de un cultivo positivo, ya que todo examen directo por coloración tiene sus limitaciones. Esto puede ocurrir cuando la cantidad de gérmenes en la alícuota del

material remitido es muy pobre, por ejemplo, en líquidos de punción como el líquido pleural, articular o en la sangre.

También puede suceder que el examen directo revele la presencia de gérmenes y el cultivo sea negativo; las causas más frecuentes de esto son que el paciente esté bajo tratamiento antibiótico, que la muestra no fue tomada correctamente o fue mal remitida, o porque su transporte y conservación no fueron adecuados.

El microbiólogo puede dar al médico un informe preliminar sobre la observación de directa por la coloración de Gram en materiales normalmente estériles (LCR, bilis, médula ósea). Los exámenes directos provenientes de zonas colonizadas con microbiota normal, como esputo o materia fecal, sólo nos podrán informar sobre la presencia o no de reacción inflamatoria, predominio de algún tipo de bacterias o desplazamiento de la microbiota normal.

En síntesis, **la tinción de Gram permite conocer forma, agrupación y localización intra o extracelular de las bacterias y además se usa para clasificar a las bacterias en gram positivas o gram negativas**, orientando al tratamiento empírico del paciente y permitiendo el inicio del mismo en aquellas circunstancias en que su implementación es perentoria.

Coloración de Zielh-Neelsen

Esta coloración se utiliza para la tinción de micobacterias (*Mycobacterium tuberculosis* y otras especies de este género), bacterias lipofílicas que son difíciles de colorear por otras técnicas (Figura 24).

Es importante aclarar que **la presencia de bacilos ácidos-alcohol resistentes en una muestra no confirma ni descarta una tuberculosis o una infección por otras micobacterias**. Para ello es necesario obtener el cultivo y la tipificación, que otorgarán el diagnóstico definitivo. Sin embargo, una baciloscopía positiva, en muchos casos, puede orientar al médico a un diagnóstico presuntivo.

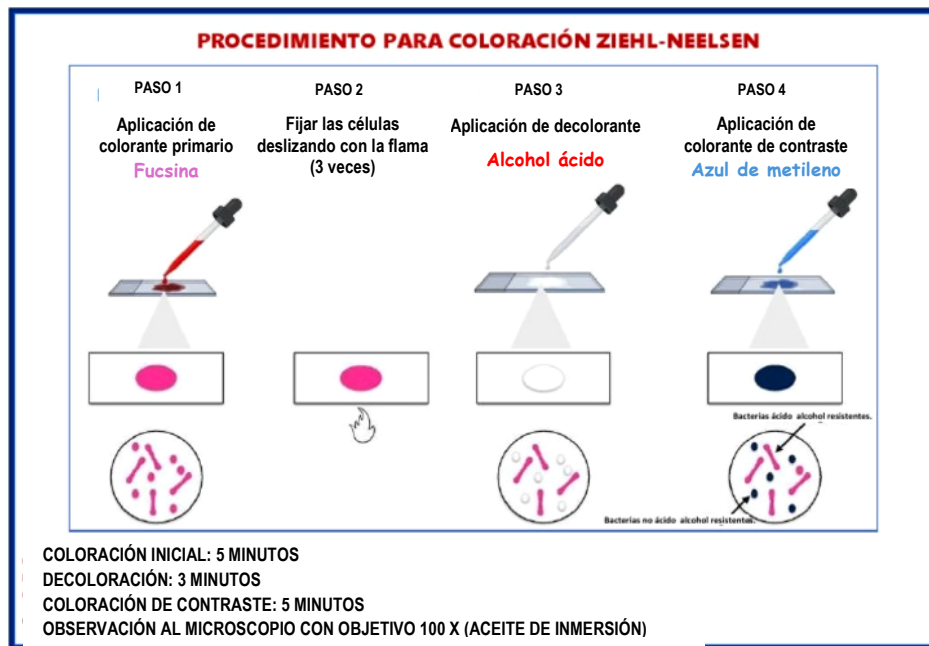


Figura 24. Esquema de los pasos de la coloración de Zielh Neelsen

La mayoría de las bacterias crecen en **medios de cultivo comunes**, que contienen los elementos nutritivos mínimos para su desarrollo (por ejemplo, agar tripticasa de soya). Hay bacterias que necesitan suplementos especiales para crecer (sangre, suero, líquido ascítico, o extracto de levadura); si los incorporamos a los medios comunes se tendrán **medios enriquecidos** (por ejemplo, agar sangre). Ejemplos de estas bacterias exigentes para crecer son: *N. gonorrhoeae*, agente de la gonorrea, *Haemophilus influenzae* causante de meningitis, entre otros. Existen **medios diferenciales**, que, en virtud de sus componentes químicos, darán características especiales a determinados géneros bacterianos, por el diferente aspecto de sus colonias en el cultivo (ejemplo agar con eosina y azul de metileno). Los **medios selectivos** contienen componentes que facilitan el crecimiento de ciertas bacterias inhibiendo el desarrollo de otras. Estos medios se usan para cultivar muestras que provienen de zonas normalmente colonizadas (ejemplo Thayer Martin para aislar *Neisseria gonorrhoeae*, medio SS para recuperar *Salmonella* spp. o *Shigella* spp.).

Actualmente existen diversos **métodos automatizados**. Las ventajas de utilizar estas plataformas radican en la mayor rapidez en el diagnóstico etiológico y la obtención de la sensibilidad antibiótica. Además, favorece la reducción de riesgo de accidentes al manipular las muestras y ahorro de tiempo del personal de laboratorio. Sin embargo, también hay que contemplar algunas desventajas de estos sistemas, como los costos

elevados de reactivos y de mantenimiento, la dependencia de servicios técnicos, la limitación sobre especies microbianas inusuales o de difícil identificación y la necesidad de compromiso de todo el personal del laboratorio en su funcionamiento. Como ejemplos de estos métodos de uso frecuente podemos citar al BACTEC®, que permite conocer la positividad de una muestra para *Mycobacterium tuberculosis* en 7 días (Figura 25), y el BACTALERT®, que permite conocer la positividad de un hemocultivo en pocas horas.



Figura 25. Método automatizado BACTEC

3.3. TIPIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

La tipificación bacteriana puede llevarse a cabo mediante métodos fenotípicos (manuales o automatizados), métodos inmunológicos, métodos moleculares (PCR, secuenciación) y métodos proteómicos (MALDI-TOF). De todos ellos, los métodos más ampliamente utilizados en la práctica clínica son los métodos fenotípicos.

Métodos fenotípicos

El examen microscópico y la observación del aspecto de las colonias en los medios de cultivo permiten una identificación presuntiva del género de las bacterias aisladas. Para **la identificación fenotípica de las bacterias en género y especie** es necesario realizar pruebas de tipificación que consisten en un cierto número de reacciones bioquímicas o enzimáticas que generalmente se llevan a cabo en medios de cultivo diferenciales. La mayoría de las pruebas de identificación demoran entre 24 y 48 horas. La identificación es importante para el médico porque en base a las referencias ya conocidas sobre la sensibilidad o resistencia de determinadas bacterias, puede iniciar

un tratamiento ATM empírico hasta conocer el resultado del antibiograma y hacer luego, un cambio de antibiótico, si es necesario.

Podemos decir que es fundamental la identificación bacteriana con fines diagnósticos, terapéuticos y epidemiológicos.

Actualmente, la identificación bacteriana se realiza por medio de métodos convencionales, basados en las características fenotípicas, puesto que su realización y coste los hace más asequibles. Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas. El cultivo, cuando es factible, continúa siendo el método diagnóstico de elección; permite el aislamiento del microorganismo implicado, su identificación, el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos y facilita la aplicación de marcadores epidemiológicos.

En el proceso de identificación bacteriana tradicional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial, en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de éstas.

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas. Además, existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipuebas (manuales o automatizados) con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias.

Métodos inmunológicos

Las técnicas inmunológicas de detección de antígenos se fundamentan en la afinidad antígeno-anticuerpo y permiten detectar la presencia de microorganismos o fragmentos de estos en las muestras clínicas. Son técnicas especialmente útiles en aquellos casos en los que el microorganismo causal crece lentamente o no crece en los medios de

cultivo. Además, los resultados de estos no se ven alterados por la administración previa de ATM. Como inconvenientes principales de las mismas, cabe destacar que no ofrecen información sobre la sensibilidad del microorganismo detectado a los ATM, y que en algunos casos no han alcanzado los niveles de sensibilidad y especificidad deseados. Existen pruebas antigénicas para la detección de *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *Streptococcus pyogenes* (grupo A), *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Escherichia coli* (toxina Shiga), *Shigella dysenteriae* (toxina Shiga), entre otros.

Métodos moleculares

Las principales limitaciones de los sistemas de identificación fenotípica consisten en que no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas y que una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos. Por ello, los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos.

En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador *housekeeping* está presente en todas las bacterias. Se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución. Además, tiene un tamaño adecuado para realizar el análisis. El ARNr 16S además de ser útil para la detección de bacterias, proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias bacterianas. Con el avance de las técnicas de secuenciación, se han ido utilizando genes cuya secuencia permite una mayor precisión o una diferenciación intra-especie en biovariedades o genovariedades.

Entre las técnicas de microbiología molecular, se han desarrollado técnicas rápidas de detección de los principales patógenos causantes de infecciones graves, como bacteriemia o meningitis. Existen pruebas de hibridación de ácidos nucleicos que mediante sondas identifican los microorganismos presentes en los hemocultivos. También hay sistemas de PCR a tiempo real (RT-PCR) que utilizan cebadores específicos y secuencias en sondas para amplificar el ADN diana de múltiples microorganismos, capaces de detectar *M. tuberculosis* en muestra respiratoria, diferenciar *S. aureus* sensible y resistente a la meticilina en hemocultivos y heridas. Finalmente, otro sistema basado en la caracterización de ácidos nucleicos utiliza la técnica de hibridación de ARN ribosómico de microorganismos específicos con sondas péptidos de ácidos nucleicos (PNA) con detección *in situ* con microscopio de fluorescencia (FISH). La duración para la realización de la técnica es inferior a dos

horas, se puede utilizar sobre hemocultivos y líquidos peritoneales y detecta y diferencia diferentes microorganismos según la fluorescencia, entre ellos *S. aureus* de estafilococos coagulasa-negativa y *E. faecalis* de *E. faecium*.

Métodos proteómicos

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas (MALDI-TOF). En la actualidad, el principal reto de la proteómica es su automatización y la integración de las tecnologías con la bioinformática.

En el laboratorio de microbiología, MALDI-TOF destaca por su alta tasa de identificación y rapidez (resultados en minutos). También proporciona ventajas en la gestión del paciente como la administración de antibióticos más eficaces, reducción en los tiempos de hospitalización y disminución en gasto sanitario por paciente. Como inconvenientes en la metodología hay que mencionar que es crucial mantener las condiciones indicadas por el fabricante, requiere calibraciones y controles de calidad frecuentes y es imprescindible un periodo de formación para los usuarios. También requiere la validación de las plataformas comerciales y mantenimiento frecuente.

3.4. ANTIBIOGRAMA

Antibiograma es el estudio *in vitro* de la sensibilidad de las bacterias a los antimicrobianos (ATM). **ATM** designa a aquellas sustancias químicas que, producidas por microorganismos o en forma sintética, son capaces de inhibir el crecimiento o destruir bacterias.

Una de las funciones más importantes del laboratorio de microbiología es determinar la sensibilidad de un patógeno a los agentes ATM. Aunque algunos microorganismos predeciblemente son sensibles a antibióticos eficaces, con frecuencia las opciones terapéuticas se ven limitadas para otros microorganismos por resistencia a los ATM o toxicidad medicamentosa.

Las pruebas de sensibilidad *in vitro* son una de las tareas más complejas que se realizan en el laboratorio de microbiología, las pruebas han de ser llevadas a cabo de modo reproducible y exacto. Los métodos para realizar estas pruebas están definidos por estándares publicados y revisados anualmente por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI; antes NCCLS), grupo de consenso que representa a laboratorios clínicos, industria y agencias gubernamentales (www.clsi.org). Los estándares definen detalladamente cómo debe realizarse cada método de pruebas de sensibilidad y cómo han de informarse e interpretarse los resultados. Los documentos aportan también

directrices para la selección de las clases de fármacos específicos que han de probarse frente a cada microorganismo.

Son varios los métodos que han sido utilizados para valorar la actividad de los ATM frente a las bacterias. Históricamente, los métodos fueron divididos en métodos de dilución y difusión, métodos cuantitativos y cualitativos, métodos manuales y automatizados. También se han elaborado métodos específicos para determinar los mecanismos de resistencia concretos tales como producción de β -lactamasas o la presencia de genes específicos que codifican la resistencia.

El estudio de sensibilidad a los ATM se realizará siempre que el microorganismo responsable de la infección tenga un comportamiento variable frente a los ATM, es decir, algunos aislamientos sean sensibles y otros resistentes.

Un antibiograma no se realiza si:

- Las bacterias son **siempre sensibles a un antibiótico de uso clínico habitual**.
Por ejemplo: *N. meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Bacillus anthracis*.
- Las bacterias no crecen en medios de cultivo o lo hacen muy lentamente. Por ejemplo: *Gardnerella vaginalis*, *Treponema pallidum*.

Generalmente una bacteria presenta sensibilidad a más de un ATM; para la **elección del mejor tratamiento** debe tenerse en cuenta:

- La sensibilidad del microorganismo.
- Las características del ATM: su farmacología, su mecanismo de acción, la vía de administración, su toxicidad y costo.
- Las características del enfermo y la presencia de comorbilidades: insuficiencia renal, insuficiencia hepática, desnutrición, malabsorción intestinal, localización anatómica de la infección, alteraciones inmunológicas, etc.

La causa principal del fracaso de un tratamiento ATM es no tener en cuenta estas variables.

Estudios de la susceptibilidad a los antimicrobianos

El antibiograma es el estudio *in vitro* de la susceptibilidad a los antimicrobianos (ATM). Este estudio puede realizarse mediante diversas técnicas *in vitro* manuales o automatizadas. Todos los ensayos están estandarizados bajo criterios internacionales y cumplen con los estándares de calidad para garantizar exactitud y reproducibilidad de sus resultados.

La decisión del tipo de estudio y los ATM a ensayar dependerán de numerosas variables, como el tipo de bacteria aislada, la disponibilidad de equipamiento o de ATM para los ensayos y la localización de la infección, entre otros. Por otro lado, los resultados de las pruebas requieren una **lectura interpretada** previa al informe de resultados. La lectura interpretada del antibiograma no es una simple actividad técnica, es un requerimiento profesional que el microbiólogo debe realizar para que, mediante el reporte informado, el médico pueda dirigir la prescripción y el uso adecuado de los antibióticos.

La forma o el método por medio del cual el laboratorio de microbiología comunica los resultados del antibiograma, el uso de informes selectivos y la incorporación de notas de cómo interpretar los resultados, pueden tener un impacto importante y decisivo en la decisión médica de la prescripción de los antibióticos. En este proceso se requieren, además del conocimiento de los mecanismos de resistencia, otros relacionados con la farmacología del antimicrobiano y la experiencia clínica.

Sin embargo, no son solo las mencionadas consideraciones las que tiene que hacer el médico cada vez que debe seleccionar un tratamiento antibiótico para un determinado paciente, ya que debe además considerar, la gravedad del cuadro clínico, la vía de administración, la necesidad de utilizar un antibiótico bactericida, las comorbilidades del paciente, entre las principales variables, lo que influirá de manera decisiva en la selección de la mejor terapéutica.

Es evidente que con el reporte informado del antibiograma la gestión de los resultados microbiológicos es más adecuada y favorece la colaboración de los profesionales de la salud en la toma de decisiones, mejorando la calidad de la atención de los pacientes.

Existen diferentes enfoques para el estudio de la RAM. Las técnicas de estudio de la susceptibilidad a los ATM abarcan 3 grandes grupos de métodos de estudio: métodos fenotípicos (manuales o automatizados), métodos moleculares (PCR, secuenciación) y métodos proteómicos (MALDI-TOF) (Figura 26).

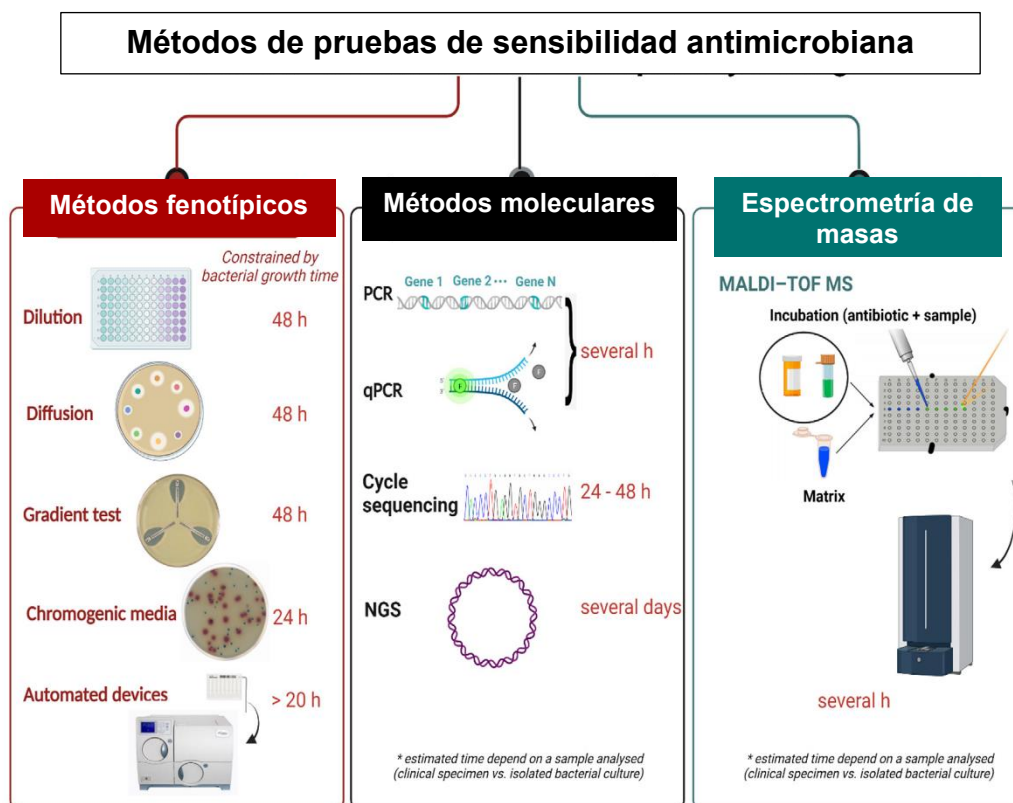


Figura 26. Métodos de estudio de la resistencia antimicrobiana. Extraído de Antibiotics 2022, 11(4), 427; <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>

En general, la detección de la resistencia a los antimicrobianos (RAM) puede realizarse de diversas maneras. Los métodos más utilizados incluyen:

- A) Detección fenotípica de la resistencia a los ATM (métodos cualitativos o cuantitativos, manuales o automatizados)
- B) Detección de los mecanismos bioquímicos de resistencia
- C) Detección de los genes de resistencia.

A- Detección fenotípica de la resistencia a los ATM

1- Métodos cualitativos

a- Método de difusión en agar

El método de difusión en agar más utilizado es el método de Kirby-Bauer. El procedimiento manual está estandarizado y consiste en una serie de etapas secuenciales. Primero se cultiva y aísla el microorganismo, después se prepara una suspensión bacteriana de concentración estandarizada, luego, con un hisopo estéril se siembran las bacterias sobre la placa de agar (Agar Mueller Hinton) y a continuación se colocan discos de papel estéril que contienen una concentración definida de ATM. Las placas se incuban en estufa durante 18 a

24 horas y luego con una regla estandarizada se determina el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento alrededor del disco o **halo de inhibición** del crecimiento bacteriano (Figuras 27 y 28).

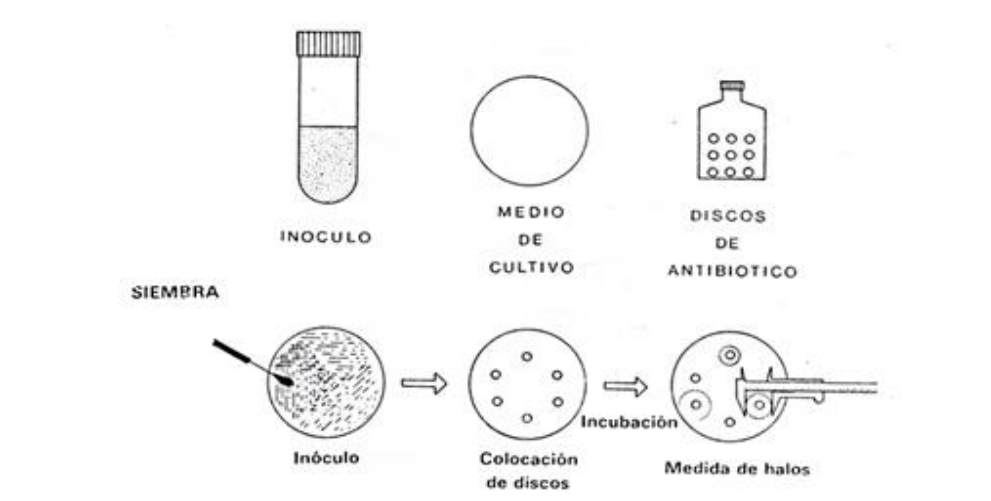


Figura 27. Esquema de procedimiento de antibiograma

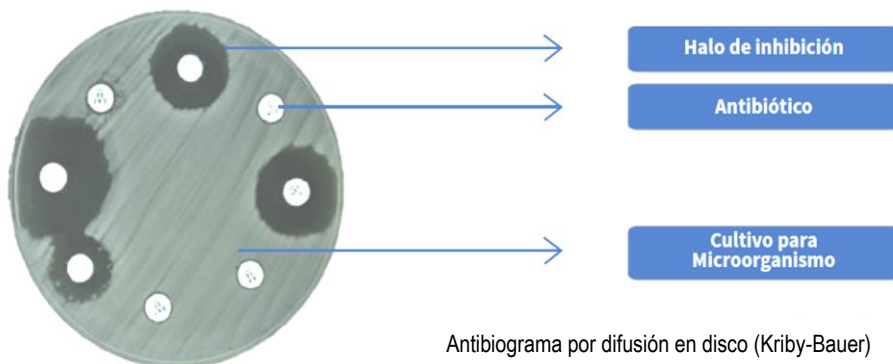


Figura 28. Placa de agar con antibiograma por difusión

Para cada ATM, el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento se relaciona con la sensibilidad del microorganismo: **cuanto mayor sea la zona, más sensible es el microorganismo al ATM ensayado**. Sin embargo, no se puede comparar el tamaño del halo de inhibición entre ATM diferentes (Figura 29).

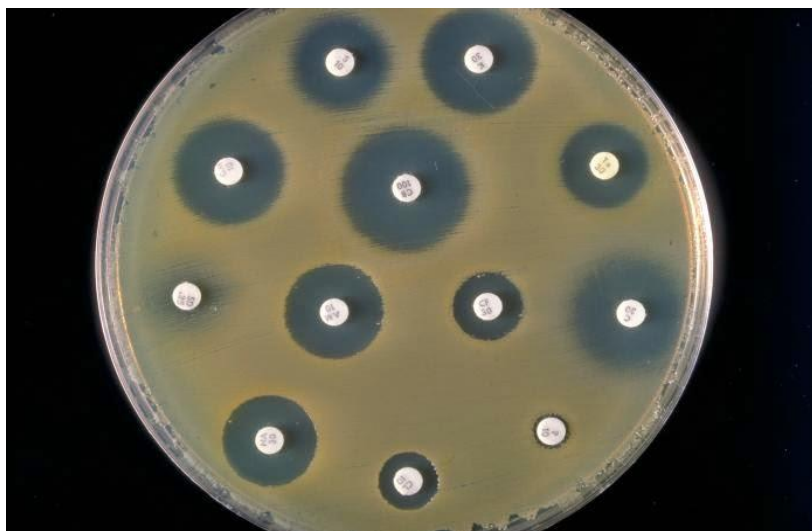


Figura 29. Fotografía de placa de agar con antibiograma por difusión

Una vez anotados los diámetros de los halos de inhibición, se recurre a tablas de organismos internacionales (CLSI, EUCAST). Las tablas indican los resultados para cada ATM y para cada microorganismo y los valores se actualizan en forma anual con datos mundiales (Figura 30).

A	Ampicilina ^{a,c}	10	≤13	14-16	≥17	≥32	≤8	16-22
	Cefalotina ^{c,d}	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	15-21
	Cefazolina ^{c,d}	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Gentamicina ^e	10	≤12	13-14	≥15	≥8	≤4	19-26
B	Amoxicilina/ácido clavulánico	20/10	≤13	14-17	≥18	≥16/8	≤8/4	19-25
	Ampicilina/sulbactam	10/10	≤11	12-14	≥15	≥32/16	≤8/4	20-24
	Piperacilina/tazobactam	100/10	≤17	18-20	≥21	≥128/4	≤16/4	24-30
	Ticarcilina/ácido clavulánico	75/10	≤14	15-19	≥20	≥128/2	≤16/2	25-29
	Mezlocilina	75	≤17	18-20	≥21	≥128	≤64	23-29
	Ticarcilina	75	≤14	15-19	≥20	≥128	≤16	24-30
	Piperacilina	100	≤17	18-20	≥21	≥128	≤16	24-30
	Cefamandol	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	26-32
	Cefonicid	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	25-29
	Cefuroxima (oral)	30	≤14	15-22	≥23	≥32	≤4	20-26
	Cefpodoxima	10	≤17	18-20	≥21	≥8	≤2	23-28
	Cefixima	5	≤15	16-18	≥19	≥4	≤1	23-27
	Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	23-29
	Cefotetan	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16	28-34
	Cefmetazol	30	≤12	13-15	≥16	≥64	≤16	26-32
	Cefoperazona ^a	75	≤15	16-20	≥21	≥64	≤16	28-34
	Cefotaxima ^{a,d}	30	≤14	15-22	≥23	≥64	≤8	29-35
	Ceftizoxima ^a	30	≤14	15-19	≥20	≥32	≤8	30-36
	Ceftriaxona ^{a,d}	30	≤13	14-20	≥21	≥64	≤8	29-35
	Cefepima	30	≤14	15-17	≥18	≥32	≤8	29-35
	Imipenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	26-32
	Meropenem	10	≤13	14-15	≥16	≥16	≤4	28-34
	Amikacina	30	≤14	15-16	≥17	≥32	≤16	19-26
	Ciprofloxacino ^{a,c}	5	≤15	16-20	≥21	≥4	≤1	30-40
	Levofloxacino	5	≤13	14-16	≥17	≥8	≤2	29-37
	Trimetoprim/sulfametoxazol ^{a,c}	1,25/23,75	≤10	11-15	≥16	≥8/152	≤2/38	24-32

Figura 30. Tabla donde se presentan los patrones estándar de halos de inhibición, puntos de corte equivalente a la CIM para Enterobacterias y halo de inhibición para la cepa *E. coli* ATCC 25922.

El resultado de esta medición se interpreta basándose en los puntos de corte tabulados en las tablas CLSI vigente las cuales contienen los criterios Resistente, Intermedio, Sensible o No Sensible, según corresponda para cada bacteria en estudio.

Actualmente se ha incorporado la categoría de Susceptibilidad dosis dependiente (SDD) en el caso de Cefepime, solamente para Enterobacterias.

Sensible (S): Una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con un diámetro de zona por encima del punto de corte susceptible se inhiben por las concentraciones usualmente alcanzadas del agente antimicrobiano, empleando la dosis recomendada para tratar el sitio de infección, lo que resulta en probable eficacia clínica.

Susceptibilidad dosis dependiente (SDD): Una categoría definida por un punto de corte que implica que la susceptibilidad de un aislado depende del régimen de dosificación que se utiliza en el paciente. Para lograr niveles que probablemente sean clínicamente efectivos contra los aislamientos, es necesario usar un régimen de dosificación (es decir, dosis más altas, dosis más frecuentes, o ambas) que resulte en una exposición al fármaco más alta que la lograda con la dosis que se usó para establecer el punto de corte susceptible.

Intermedio (I): Una categoría definida por un punto de corte que incluye aislamientos con diámetros de zona dentro del rango intermedio, que se acercan a niveles de sangre y tejidos generalmente alcanzables y/o cuyas tasas de respuesta pueden ser más bajas que para aislamientos susceptibles.

No susceptible (NS): Una categoría utilizada para aislamientos para los que solo se designa un punto de corte susceptible debido a la ausencia o la rara aparición de cepas resistentes. Los aislamientos para los cuales los diámetros de zona de inhibición están por debajo del valor indicado como punto de corte susceptible deben informarse como no susceptibles.

Resistente (R): Una categoría definida por un punto de corte que implica que los aislamientos con un diámetro de zona en o por debajo del punto de resistencia no están inhibidos por las concentraciones usualmente alcanzables del agente antimicrobiano en programas de dosificación normales, por tanto, la eficacia clínica no se ha demostrado de manera confiable en los estudios de tratamiento.

b- Detección de mecanismos de resistencia bacteriana

La detección de enzimas bacterianas que degradan antibióticos es crucial en el campo de la microbiología clínica y la resistencia a los antimicrobianos. Estas enzimas, como las β -lactamasas, carbapenemasas y metalo- β -lactamasas (MBL), son producidas por bacterias patógenas y tienen la capacidad de inactivar una

amplia gama de antibióticos, comprometiendo así la eficacia de los tratamientos antimicrobianos. Identificar la presencia de estas enzimas permite a los médicos elegir los antibióticos más adecuados y diseñar estrategias de tratamiento personalizadas, mejorando las tasas de éxito terapéutico y reduciendo la mortalidad asociada a infecciones resistentes.

Además, la detección temprana de estas enzimas es fundamental para controlar la propagación de bacterias resistentes en entornos hospitalarios y comunitarios. Mediante técnicas como la PCR, ELISA y pruebas fenotípicas, los laboratorios pueden identificar rápidamente cepas productoras de enzimas degradantes de antibióticos, permitiendo la implementación de medidas de control de infecciones y el uso racional de antibióticos.

Un ejemplo clásico de enzimas que degradan ATM son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas median la resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido (tercera generación) (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) y monobactámicos (aztreonam), pero no afectan a las cefamicinas (cefotixina) ni a los carbapenémicos (meropenem o imipenem). Si se utiliza una de las clases de fármacos anteriores para tratar una infección clínica, la presencia de un organismo productor de BLEE puede provocar el fracaso del tratamiento. Las BLEE pueden ser difíciles de detectar porque tienen diferentes niveles de actividad contra diversas cefalosporinas. Por lo tanto, la elección de qué agentes antimicrobianos probar es fundamental. Por ejemplo, una enzima puede hidrolizar activamente la ceftazidima, lo que da como resultado concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de ceftazidima de 256 µg/ml, pero tener poca actividad sobre la cefotaxima, lo que produce CIM de solo 4 µg/ml. Si se detecta una BLEE, todas las penicilinas, cefalosporinas y aztreonam *deben notificarse como resistentes*, incluso si los resultados de las pruebas *in vitro* indican susceptibilidad.

El CLSI recomienda realizar una confirmación fenotípica de los aislamientos de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* o *E. coli* que pueden producir BLEE mediante la prueba de cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ), solas y en combinación con ácido clavulánico (CLAV). La prueba se puede realizar mediante el método difusión en disco. Para la prueba, un aumento de >5mm en el diámetro de una zona para cualquiera de los agentes antimicrobianos probados en combinación con CLAV en comparación con su zona cuando se prueban solas confirma un organismo productor de BLEE (Figura 31).



Figura 31. Detección de BLEE en *E. coli*. Cefotaxima (CTX), Ceftazidima (CAZ), Acido clavulánico (CLAV).

2- Métodos cuantitativos

a- Método epsilométrico (E-test)

Una variación de la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer es la prueba E o E-test (Epsilometer AB Biodisk), que es una prueba de difusión en gradiente. Esta prueba arroja un resultado cuantitativo numérico conocido como CIM (Concentración Inhibitoria Mínima).

En esta prueba el ATM a investigar está contenido en una tira de papel con un gradiente de concentración exponencial y creciente a lo largo de la tira. El procedimiento es similar al método de difusión en agar pero, en vez de colocar diversos ATM, la prueba utiliza la tira de gradiente para una medida de la concentración de ATM en la cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Cuando la tira se coloca sobre una placa de agar con la suspensión bacteriana sembrada, se desarrolla un patrón elíptico de inhibición del crecimiento (mayor inhibición al final con una mayor concentración de ATM). Las tiras están calibradas de modo que el área en donde el crecimiento bacteriano encuentra la tira se corresponde con el valor de la CIM del ATM en relación con el microorganismo a evaluar (Figura 32). La ventaja de la prueba E es que se pueden obtener con facilidad los resultados de la CIM en relación con uno o dos ATM. Sin embargo, cuando se requiera probar un gran número de combinaciones microorganismo-ATM se prefiere utilizar otros métodos.

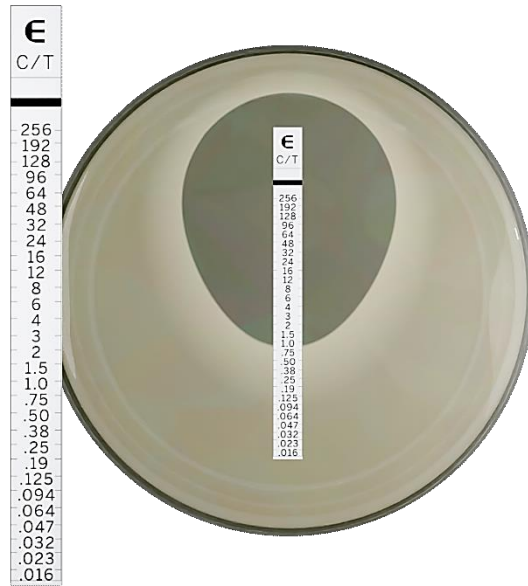


Figura 32. Prueba E (Epsilometer AB Biodisk).

b- Método de dilución en caldo

Los métodos de dilución fueron los primeros procedimientos cuantitativos elaborados para probar la sensibilidad a los ATM. Estos procedimientos pueden ser manuales o automatizados. En los métodos manuales se preparan diluciones seriadas de ATM en un medio líquido (caldo estéril). Se utiliza un esquema con dilución a la mitad (p. ej., 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,1; 1,5, 0,75 mg/mL). A continuación, se inocula el mismo volumen de la suspensión bacteriana en cada tubo con el ATM, se incuba en estufa y se determina (en forma visual o turbidimétrica) la menor concentración del ATM que inhibe el microorganismo. Estos métodos son conocidos como **pruebas de concentración inhibitoria mínima (CIM)** o pruebas de sensibilidad cuantitativa.

Teniendo en cuenta que la inhibición del crecimiento podría ser bactericida o bacteriostática, también se puede determinar la **Concentración Bactericida Mínima (CBM)** definida como la menor concentración de ATM que mata a la bacteria. El procedimiento es similar al de la CIM pero comprende un paso posterior donde cada suspensión bacteriana con el ATM se siembra en una placa de agar y se incuba para verificar la muerte bacteriana. La CIM y CBM se expresan en forma de concentración de ATM y pueden coincidir o no (Figura 33).

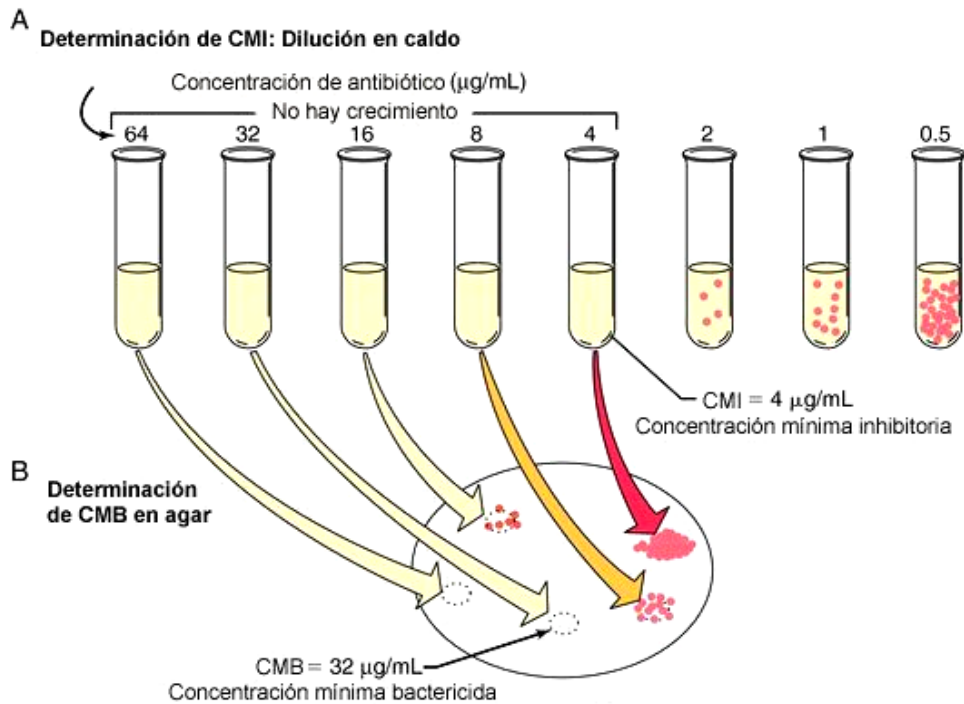


Figura 33. Esquema de procedimiento de Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima. CIM: 4 $\mu\text{g/mL}$; CBM: 32 $\mu\text{g/mL}$

c- Pruebas de microdilución en caldo

Las pruebas de dilución en agar llevadas a cabo en placas de Petri y las pruebas de dilución en caldo realizadas en tubos de ensayo, se utilizan principalmente en laboratorios de investigación porque son técnicas engorrosas y no están adaptadas a pruebas con grandes cantidades de muestras. Sin embargo, las pruebas de dilución en caldo efectuadas en placas de microdilución son más utilizadas (Figura 34)

Se han elaborado versiones automatizadas de estas pruebas de microdilución y se las utiliza en la mayoría de los laboratorios. Hay una variedad de sistemas automatizados disponibles en el mercado para ayudar a reducir el tiempo técnico requerido para realizar y registrar pruebas de sensibilidad de rutina. Otros sistemas utilizan cultivos líquidos y detectan el efecto de los antibióticos en la tasa de crecimiento bacteriano a través de la medición de la turbidez (nefelometría) o la producción de CO_2 . Estos sistemas automatizados pueden acortar significativamente el tiempo de incubación necesario, con la posibilidad de que algunos resultados estén disponibles en el mismo día de trabajo.

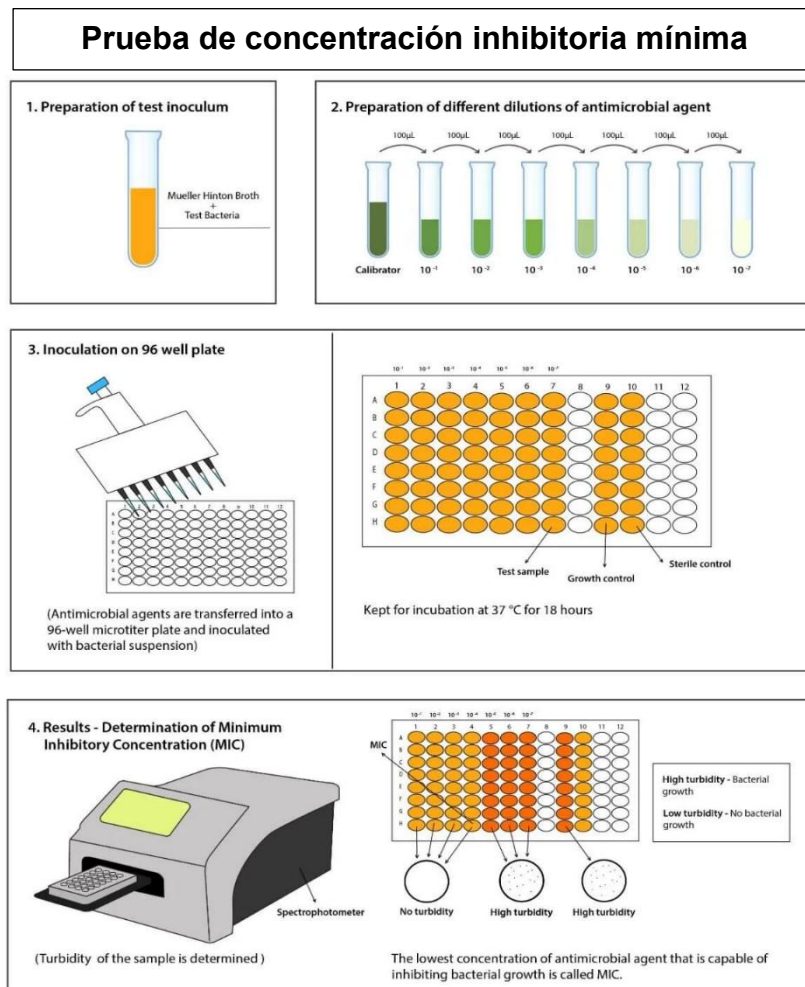


Figura 34. Esquema de procedimiento de obtención de CIM en microplaca. Extraído de <https://microbe-investigations.com/minimum-inhibitory-concentration-test/>

Los profesionales que realizan los estudios de susceptibilidad a los ATM deben utilizar los manuales internacionales provistos por organismos oficiales (CLSI, EUCAST) siempre actualizados al año en curso.

Los resultados de las pruebas de dilución y de las pruebas de difusión están relacionados. Hay una correlación lineal inversa entre el tamaño de la zona y el valor de la CIM: cuanto mayor sea la zona de inhibición del crecimiento (más sensible es el microorganismo al ATM), más pequeño será el valor de la CIM. De esta manera, es posible extrapolar del tamaño medido en la zona de inhibición el correspondiente valor de la CIM. Además, los criterios de interpretación que se aplican a las pruebas de CIM también se aplican a las pruebas de difusión. Así, en relación con la mayoría de las pruebas microorganismo-ATM, las pruebas de difusión y las pruebas de dilución son igualmente exactas en la predicción de la sensibilidad antimicrobiana. Las pruebas de dilución reciben comúnmente la denominación de pruebas cuantitativas, mientras que

las pruebas de difusión se denominan pruebas cualitativas. Es decir, las pruebas de dilución suelen informarse como un número o un valor de CIM y los resultados de las pruebas de difusión como sensible, intermedio o resistente.

5. INFORME DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Los datos obtenidos del procesamiento de las muestras serán informados al médico por el laboratorio. En el mismo se indicarán los datos de filiación del paciente, tipo de muestra analizada, resultados del examen directo (en fresco y coloraciones), cultivo, tipificación del microorganismo y resultado del estudio de sensibilidad antimicrobiana.

6. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de los estudios obtenidos deben interpretarse en forma crítica teniendo en cuenta numerosos factores, como los aspectos demográficos, clínicos y epidemiológicos del paciente, la recolección y conservación de la muestra biológica, la sensibilidad y especificidad de la prueba solicitada, el tipo de muestra, el diagnóstico presuntivo y la etapa clínica de la enfermedad infecciosa.

De la correcta interpretación de los resultados dependerá el diagnóstico que se realizará y el tratamiento más adecuado que se le brindará al paciente.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recolección, transporte y conservación de las muestras. Procedimientos en Microbiología Clínica.

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Procesamiento general de las muestras microbiológicas. Procedimientos en Microbiología Clínica.

Basualdo JA, Coto C, de Torres R. Microbiología Biomédica. Tomo 1. 3ra ed. Buenos Aires: Editorial Atlante, 2023.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaüer MA. Microbiología Médica. 9a ed. Madrid, España, 2021.

Mandell GL, Dolin R, Blaser MJ. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. 9º ed, 2021, Saunders.

Tortora GJ, Case CL, Funke Berdell R. Introducción a la Microbiología. 12^{na} ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2017.

Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC. Koneman Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas. 7^{ta} ed. México DF: Editorial Wolters-Kluwer, 2017.

Riedel S, Morse SA, Mietzner T, Miller S. Microbiología Médica. Jawetz, Melnick y Adelberg. 28º ed. México DF. Mcgraw-Hill Education, 2019.

Järvinen A et al. Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR-and microarray-based assay. BMC Microbiol 2009; 9:161.

Vasala A et al. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. Front Cell Infect Microbiol 2020; 10: 308.

Pérez I et al. How to interpret diagnostic tests. Medwave 2021;21:e8432.

Sancho et al. Pruebas diagnósticas. ¿Cómo describir su validez? Cir Esp 2022; 100: 590-594.