

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE CONCLUSIÓN DEL SERVICIO SOCIAL

Actividades relacionadas con la profesión

19/07/2024-21/02/2025



IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS RELACIONADOS CON ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN PACIENTES DEL INER MEDIANTE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES

PRESENTA

BRITANI AIDEE REZA CRUZ

MATRICULA

2202032202

ASESOR INTERNO:

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava
Universidad Autónoma Metropolitana-
Xochimilco Laboratorio de Ecología
microbiana/Departamento de Sistemas
Biológicos

ASESOR EXTERNO:

Q.B.P. Mario Alberto Mújica Sánchez
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias Laboratorio de
Microbiología Clínica

INDICE

1.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>3</i>
2.	<i>OBJETIVO GENERALES Y ESPECÍFICOS.....</i>	<i>4</i>
3.	<i>METODOLOGÍA.....</i>	<i>5</i>
	<i>AREA DE BACTERIOLOGIA.....</i>	<i>10</i>
	<i>AREA DE MICOLOGIA.....</i>	<i>14</i>
	<i>AREA DE BIOLOGIA MOLECULAR.....</i>	<i>18</i>
4.	<i>ACTIVIDADES REALIZADAS</i>	<i>21</i>
5.	<i>METAS ALCANZADAS</i>	<i>22</i>
6.	<i>RESULTADOS Y CONCLUSIONES</i>	<i>25</i>
7.	<i>RECOMENDACIONES Y APORTE A LA SOCIEDAD</i>	<i>26</i>
8.	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>27</i>

1. INTRODUCCIÓN

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) es un centro hospitalario de alta especialidad dedicado al estudio, diagnóstico, tratamiento e investigación de las enfermedades respiratorias en México. Como referente nacional en esta área, el INER cuenta con laboratorios especializados que apoyan el manejo clínico mediante técnicas avanzadas para la identificación precisa de agentes patógenos que afectan el sistema respiratorio.

Durante mi servicio social en este instituto, tuve la oportunidad de integrarme al área de laboratorio de microbiología clínica, donde participé en el procesamiento y análisis de diversas muestras biológicas relacionadas con enfermedades respiratorias. En este contexto, apliqué técnicas microbiológicas, inmunológicas y moleculares para la detección de agentes infecciosos, contribuyendo así al diagnóstico oportuno y eficaz de los pacientes.

Mi experiencia incluyó el manejo de cultivos bacteriológicos y micológicos, la realización de pruebas como ELISA para la detección de antígenos y anticuerpos, así como la ejecución de técnicas moleculares, entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el uso de sistemas automatizados como FilmArray para la identificación rápida de paneles virales. Además, cumplí con estrictas normas de bioseguridad y manejo adecuado de muestras para garantizar la confiabilidad de los resultados y la seguridad del personal.

Este periodo me permitió desarrollar competencias técnicas y profesionales, así como una comprensión profunda del papel crucial que desempeña el laboratorio clínico en la salud pública. La experiencia adquirida reafirmó mi compromiso con la calidad, la ética y la vocación por contribuir al bienestar de la comunidad mediante el apoyo diagnóstico en enfermedades respiratorias.

2. OBJETIVO GENERALES Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar microorganismos patógenos asociados a enfermedades infecciosas en pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), mediante la aplicación de técnicas microbiológicas y moleculares en el área de Microbiología Clínica, contribuyendo al diagnóstico oportuno y al manejo clínico adecuado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Supervisar y verificar la correcta recepción de muestras clínicas, asegurando que cumplan con los criterios de calidad y condiciones de transporte requeridas, así como colaborar en la toma de muestras de hisopado y sangre.
2. Emplear técnicas microbiológicas convencionales, incluyendo la siembra en medios de cultivo y la realización de tinciones diferenciales, con fines diagnósticos.
3. Ejecutar pruebas bioquímicas convencionales y automatizadas, así como utilizar equipos especializados para la identificación precisa de bacterias y la elaboración de perfiles de sensibilidad antimicrobiana mediante antibiogramas.
4. Procesar muestras micológicas mediante cultivo e identificación, y aplicar pruebas inmunológicas como ELISA para la detección de antígenos o anticuerpos fúngicos.
5. Colaborar en la aplicación de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección de ácidos nucleicos de microorganismos patógenos de importancia clínica.
6. Cumplir rigurosamente con las normas de bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio durante la manipulación, análisis y disposición de muestras infecciosas.

3. METODOLOGÍA

En el laboratorio se llevo a cabo la recepción, verificación y registro de las muestras biológicas enviadas, asegurando que cumplieran con los criterios establecidos de identificación mediante un etiquetado legible con el nombre del paciente, así como su adecuada conservación y transporte en condiciones óptimas. Se incluía la toma de muestras específicas como sangre para la prueba QuantiFERON-TB Gold y exudado nasofaríngeo para diagnóstico viral por PCR. Se procesaban diversas muestras biológicas, tales como expectoraciones, aspirado bronquial, líquido pleural, médula ósea, orina, lavado broncoalveolar, sangre, plasma, suero, exudados, puntas de catéter, coprocultivos, líquido cefalorraquídeo, jugo gástrico y biopsias.

Las técnicas microbiológicas aplicadas incluían tinción de Gram y Ziehl-Neelsen, así como la lectura e interpretación de frotis y sedimentos urinarios mediante microscopía óptica para la identificación de microorganismos patógenos. Además, se realizaban estudios moleculares urgentes mediante plataformas como FilmArray, que permiten la detección rápida y simultánea de múltiples patógenos respiratorios.

VALORACIÓN Y TINCIÓN DE GRAM

La tinción de Gram es una herramienta esencial en microbiología clínica. Consiste en teñir las bacterias para clasificarlas en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, en función de la estructura de su pared celular. Esta técnica se basa en la capacidad de las bacterias de retener un colorante primario (cristal violeta) tras un proceso de decoloración. La técnica consiste en fijar la muestra bacteriana sobre un portaobjetos mediante calor, seguido de la aplicación del colorante primario, cristal violeta, que tiñe todas las células. Posteriormente, se añade lugol, que actúa como mordiente y forma un complejo con el cristal violeta. Luego, se realiza una decoloración con alcohol o acetona; este paso es crítico, ya que las bacterias Gram positivas retienen el colorante debido a su gruesa capa de peptidoglucano, mientras que las Gram negativas lo pierden. Finalmente, se aplica safranina como colorante de contraste, tiñendo de rosa a las bacterias Gram

negativas. Las bacterias Gram positivas se observan de color violeta y las Gram negativas de color rosa al microscopio óptico.

MUESTRAS RESPIRATORIAS (EXPECTORACIÓN, ASPIRADO BRONQUIAL Y LAVADO BRONCOALVEOLAR)

Para evaluar la calidad de estas muestras respiratorias se consideraron tanto sus características físicas como su valor microscópico. Una muestra de expectoración era considerada adecuada si presentaba una apariencia mucopurulenta, es decir, flema sin presencia de saliva. Posteriormente, se realizaba un examen microscópico directo a través de un frotis teñido con la técnica de Gram, procedimiento que además de permitir observar la morfología bacteriana, también permitía contar las células epiteliales y los leucocitos.

Se utilizaron los criterios de Murray y Washington para valorar la calidad de las muestras respiratorias y determinar si es adecuada para el cultivo y diagnóstico de infecciones respiratorias, basándose en el conteo de células epiteliales escamosa. Estos criterios establecen que una muestra es adecuada si contiene menos de 10 células epiteliales y más de 25 leucocitos por campo de alta resolución. En el caso de los aspirados bronquiales, también se realizaba una valoración microscópica, aunque el enfoque estaba centrado principalmente en que no superaran las 10 células epiteliales por campo, ya que una cantidad mayor podía indicar contaminación por secreciones del tracto respiratorio superior, generalmente asociada a una mala toma de muestra. Esta revisión es fundamental, dado que las células epiteliales contienen microbiota bucal que puede interferir con el análisis microbiológico.

Una vez concluida la valoración microscópica, si la muestra era considerada adecuada, se destinaba a los estudios correspondientes. Estos podían incluir baciloscopía, cultivo de bacterias piogénicas, cultivo de hongos, cultivo de micobacterias, GeneXpert MTB/RIF, panel de neumonía por PCR, e inmunofluorescencia para *Pneumocystis jirovecii* y frotis para tinciones especiales. La siembra se realizaba en medios de cultivo como agar sangre, agar

chocolate (incubados a 37 °C en estufa con CO₂) y agar MacConkey. La técnica de siembra utilizada para las muestras biológicas respiratorias era la estría en cuadrante, con el fin de lograr el aislamiento de colonias bacterianas, sin embargo para los aspirados bronquiales y lavados bronquealveolares en el agar chocolate se siembra con la técnica radial

Una vez recibida la muestra de lavado broncoalveolar (LBA), se procedía a su centrifugación con el objetivo de concentrar los elementos celulares y posibles microorganismos presentes. El sedimento resultante era empleado para la elaboración de un frotis, el cual se fijaba mediante calor y se teñía con la técnica de Gram, permitiendo así la evaluación microscópica de bacterias, leucocitos y otras estructuras celulares.

En casos con sospecha clínica de tuberculosis u otras infecciones por micobacterias, se realizaba adicionalmente la tinción de Ziehl-Neelsen. Esta técnica se basa en la capacidad de los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), como *Mycobacterium tuberculosis*, para retener el colorante fucsina fenicada incluso tras la exposición a un agente decolorante compuesto por ácido y alcohol. El procedimiento comienza con la fijación de la muestra en un portaobjetos mediante calor. Luego, se aplica fucsina fenicada, que se calienta suavemente para permitir la penetración del colorante en las paredes celulares ricas en lípidos. Después de enfriar, se enjuaga y se realiza una decoloración con una solución de alcohol-ácido, lo que elimina el colorante de las bacterias no ácido-alcohol resistentes. Finalmente, se aplica azul de metileno como colorante de contraste. Al observar la preparación al microscopio, las bacterias ácido-alcohol resistentes se visualizan de color rojo intenso, mientras que el fondo y las células no resistentes se tiñen de azul.

Posteriormente, el sedimento se sembró en medios de cultivo específicos: agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey. La siembra se realizaba mediante la técnica de estría por cuadrantes en los medios agar sangre y MacConkey, mientras que en el agar chocolate se empleaba la siembra radial para favorecer el crecimiento de microorganismos fastidiosos. Estos medios eran incubados a 37 °C

en condiciones aeróbicas o enriquecidas con CO₂, de acuerdo con los requerimientos del microorganismo sospechado.

Además del análisis microbiológico convencional, la muestra de LBA también podía destinarse a estudios complementarios como la detección de patógenos respiratorios por técnicas moleculares mediante la plataforma FilmArray®, que permite la identificación simultánea de múltiples virus y bacterias respiratorias. Asimismo, podían realizarse pruebas específicas como la detección de antígeno de *Aspergillus* (galactomanano) y la inmunofluorescencia directa para la identificación de *Pneumocystis jirovecii*.

MUESTRAS DE ORINA

La orina se analizó sin centrifugar, utilizando un asa calibrada para realizar la siembra cuantitativa en agar sangre y MacConkey. No se utiliza agar chocolate por la presencia de factores X y V. Se realizan estudios para detección de antígeno de *Histoplasma capsulatum*, cultivo bacteriano y cultivo de micobacterias, detección de galactomanano de *Aspergillus*, inmunofluorescencia para *P. jirovecii* y GeneXpert MTB/RIF. También se pueden evaluar sedimentos urinarios por microscopía para observar células, leucocitos, cilindros y microorganismos.

MUESTRAS DE LÍQUIDO PLEURAL

Esta muestra se centrifuga y el sedimento se siembra en agar sangre, chocolate y MacConkey. También se puede realizar tinción de Gram y Ziehl-Neelsen, así como cultivos para hongos, micobacterias y PCR respiratoria en caso de sospecha clínica. Adicionalmente, se pueden aplicar tinciones especiales para hongos, dependiendo del estudio solicitado.

MUESTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Debido a su escaso volumen y relevancia clínica, se analiza con extrema precaución. Se realiza frotis y tinción de Gram, cultivo bacteriano, detección de antígeno de *Cryptococcus neoformans*, antígeno de galactomanano, cultivo de

hongos, GeneXpert y panel molecular de meningitis. También se emplean tinciones especiales como tinta china para hongos capsulados y otras técnicas según el agente etiológico sospechado.

MUESTRAS DE SANGRE Y MEDULA ÓSEA

Se utilizaron frascos especiales para hemocultivo (aeróbico y anaeróbico), que son incubados en sistemas automatizados. Si el cultivo es positivo, se subcultiva en agar sangre y chocolate. En el caso de médula ósea, se pueden realizar además cultivos para hongos y micobacterias.

MUESTRAS DE SUERO

Los suero se utilizaron para estudios serológicos y moleculares, como detección de antígenos de *Cryptococcus*, galactomanano de *Aspergillus*, pruebas de PCR y cultivo en caso necesario.

MUESTRA DE EXUDADO NASOFARÍNGEO Y ORONASOFARÍNGEO

Se obtuvieron por hisopado con medio de transporte viral y se procesan por PCR multiplex para virus respiratorios (FilmArray®), SARS-CoV-2 y otros patógenos. También pueden utilizarse para cultivos bacterianos e inmunofluorescencia.

MUESTRAS DE PUNTAS DE CATÉTER

Se sembraron en agar sangre utilizando la técnica de Maki, que consiste en hacer rodar la punta del catéter sobre la superficie del agar. Un recuento superior a 15 unidades formadoras de colonias (UFC) se considera colonización significativa.

MUESTRAS DE JUGO GÁSTRICO

Utilizado principalmente para la búsqueda de *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes pediátricos o con dificultad para expectorar. Se centrifuga y se siembra el sedimento en medios especiales como Lowenstein-Jensen o MGIT para cultivo de micobacterias. También se puede realizar GeneXpert.

MUESTRAS DE COPROCULTIVOS

Se sembraron en medios selectivos y diferenciales como XLD, SS y MacConkey para aislar enteropatógenos como *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*. En algunos casos se realizan pruebas rápidas para toxinas o antígenos.

MUESTRAS DE BIOPSIAS

Los tejidos se maceraron con instrumentos estériles y se divide para los distintos estudios requeridos: cultivo bacteriano, cultivo de hongos, cultivo de micobacterias y pruebas moleculares como GeneXpert. También se realizan tinciones especiales, como Gram, Ziehl-Neelsen y coloraciones fúngicas, para evaluar la presencia de microorganismos específicos según el contexto clínico.

Una vez validadas, las muestras eran clasificadas y distribuidas a las diferentes secciones del laboratorio conforme a los requerimientos diagnósticos.

AREA DE BACTERIOLOGIA

El área de bacteriología representa uno de los pilares fundamentales del diagnóstico microbiológico clínico. En esta sección se procesan muestras de origen diverso para el aislamiento, identificación y caracterización de bacterias patógenas, mediante técnicas convencionales y automatizadas.

Una vez sembradas las muestras clínicas en medios de cultivo adecuados como agar sangre, agar chocolate, MacConkey, XLD, SS, entre otros y tras su incubación en condiciones específicas (aerobias, anaerobias, o con CO₂), se realizó la evaluación macroscópica de las colonias, considerando características como forma, tamaño, color, olor, hemólisis, entre otras. Posteriormente, se seleccionaron colonias sugestivas para continuar con pruebas de identificación bioquímica o moleculares.

Una vez seleccionadas estas colonias, se procedió a la identificación bacteriana mediante pruebas bioquímicas directamente a colonias bacterianas aisladas, con el

objetivo de orientar preliminarmente la clasificación del microorganismo, entre estas pruebas bioquímicas están:

Prueba de catalasa Esta prueba permite diferenciar bacterias catalasa positivas (como los estafilococos) de catalasa negativas (como los estreptococos). Se realiza colocando una colonia bacteriana sobre un portaobjetos y añadiendo una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 3%). La formación inmediata de burbujas (liberación de O_2) indica una reacción positiva.

Prueba de oxidasa Empleada principalmente en bacilos Gram negativos, esta prueba detecta la presencia de la enzima citocromo c oxidasa. Se utiliza un papel impregnado con reactivo de oxidasa (tetrametil-p-fenilendiamina), sobre el cual se frota una colonia bacteriana. Un cambio de color a púrpura oscuro en menos de 30 segundos indica una prueba positiva. Es útil para diferenciar fermentadores como *Escherichia coli* (oxidasa negativa) de no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* (oxidasa positiva).

Prueba de indol rápido se utiliza para identificar bacterias capaces de descomponer el triptófano en indol mediante la enzima triptofanasa. Se aplica reactivo de Kovacs directamente sobre una colonia cultivada en agar. Un resultado positivo se observa como la aparición de una coloración rosa o rojo cereza en la superficie. Esta prueba es útil en la identificación de *Escherichia coli* (indol positivo) y *Klebsiella pneumoniae* (indol negativo).

Prueba de Optoquina (prueba de sensibilidad a etilhidrocupreína): Utilizada para diferenciar *Streptococcus pneumoniae* (sensible) de otros estreptococos alfa-hemolíticos del grupo viridans (resistentes). Se siembra en agar sangre y se coloca un disco de optoquina. Una zona de inhibición mayor a 14 mm es indicativa de *S. pneumoniae*.

Prueba de Bacitracina (0.04 U): Se utiliza principalmente para diferenciar *Streptococcus pyogenes* (grupo A, sensible) de otros estreptococos beta-hemolíticos. Una zona clara alrededor del disco indica sensibilidad.

Estas pruebas rápidas fueron aplicadas como primer abordaje para clasificar microorganismos según sus características metabólicas, facilitando la selección del esquema de identificación bioquímica más apropiado para cada caso clínico.

Además de las pruebas bioquímicas manuales, en el área de Bacteriología se emplearon sistemas automatizados para la **identificación precisa y rápida de bacterias y levaduras** a nivel de especie, optimizando tanto el tiempo de respuesta como la confiabilidad del diagnóstico.

VITEK 2 Compact este sistema automatizado de identificación y susceptibilidad antimicrobiana utiliza tarjetas miniaturizadas que contienen múltiples pozos con distintos sustratos bioquímicos. Las tarjetas específicas para bacterias Gram positivas, Gram negativas o levaduras eran inoculadas con una suspensión estandarizada del microorganismo, previamente ajustada a una densidad óptica equivalente al 0.5 a 0.63 de la escala McFarland.

Una vez cargadas en el equipo, las tarjetas eran incubadas e interpretadas automáticamente por el sistema, que realiza lecturas cada 15 minutos, analizando patrones metabólicos. En un lapso de 6 a 18 horas, el sistema generaba una identificación con porcentaje de certeza, así como el perfil de susceptibilidad a antibióticos cuando correspondía.

MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) Esta técnica de espectrometría de masas se utilizaba para la identificación bacteriana y fúngica basada en el análisis del perfil proteico de cada microorganismo. Para ello, se seleccionaba una colonia pura del cultivo y se aplicaba sobre una placa metálica junto con una matriz química (ácido ferúlico o ácido cinámico). Posteriormente, la muestra era ionizada mediante un láser, generando un espectro característico de masa-tiempo de vuelo.

Este espectro se comparaba automáticamente con una base de datos interna, permitiendo identificar el microorganismo con alta precisión en menos de 10 minutos. MALDI-TOF se consolidaba como una herramienta rápida, confiable y de

bajo costo operativo, ideal para la identificación rutinaria de bacterias y levaduras clínicamente relevantes.

Una vez identificados los microorganismos clínicamente relevantes, se procedía a evaluar su **perfil de sensibilidad a los antimicrobianos**, lo cual resultaba esencial para orientar un tratamiento eficaz y específico para cada paciente. Estas pruebas podían realizarse por métodos manuales o automatizados, siendo ambos aplicados en el laboratorio según el tipo de bacteria y las directrices clínicas establecidas.

1. Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)

Este método clásico y manual consiste en sembrar una suspensión bacteriana estandarizada (equivalente a 0.5 McFarland) en una placa de agar Mueller-Hinton. Posteriormente, se colocan discos de papel impregnados con antibióticos sobre la superficie del medio. Tras la incubación a 37 °C durante 18 a 24 horas, se mide el diámetro de los halos de inhibición alrededor de los discos, los cuales se interpretan según los puntos de corte establecidos por organismos como **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)**.

Este método es especialmente útil para bacterias no frecuentes, cepas problemáticas o cuando se requiere verificar manualmente una resistencia específica.

2. Sistema automatizado VITEK® 2 Compact

Cuando el microorganismo era procesado por este sistema, además de la identificación, el equipo realizaba de forma paralela el estudio de susceptibilidad. Las tarjetas específicas contenían antibióticos en diferentes concentraciones, y el sistema determinaba la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada agente antimicrobiano probado. Los resultados se interpretan automáticamente según las guías CLSI o EUCAST y se reportan como **sensible (S), intermedio (I) o resistente (R)**.

Este método era utilizado para bacterias Gram negativas, Gram positivas y levaduras, brindando resultados confiables en un periodo de 8 a 16 horas.

3. Pruebas específicas complementarias

En casos seleccionados, también se realizaban pruebas manuales complementarias para confirmar mecanismos de resistencia, tales como:

- **Prueba de BLEE (β -lactamasas de espectro extendido)** mediante el uso de discos combinados (cefotaxima o ceftazidima con ácido clavulánico).
- **Prueba de carbapenemasa** (prueba de Hodge modificada, o colorimétrica según disponibilidad).
- **Detección de resistencia inducible a clindamicina (prueba D-test)** en *Staphylococcus* spp.

Estas pruebas eran fundamentales para orientar decisiones clínicas y epidemiológicas en infecciones nosocomiales y comunitarias.

En conjunto, estas metodologías permitían no solo identificar la presencia de un patógeno, sino también determinar con precisión cuáles antibióticos serían efectivos en su tratamiento, asegurando un enfoque terapéutico racional y contribuyendo al control de la resistencia antimicrobiana.

AREA DE MICOLOGIA

El diagnóstico de las infecciones fúngicas se llevó a cabo mediante el análisis de diversas muestras clínicas provenientes de pacientes con sospecha de micosis respiratorias o sistémicas, en su mayoría inmunocomprometidos. Las muestras procesadas incluyeron expectoraciones, lavados broncoalveolares, aspirados bronquiales, biopsias, hemocultivos y sueros. Cada una fue evaluada mediante una combinación de técnicas microbiológicas, serológicas y moleculares, con el fin de identificar las especies fúngicas causantes de enfermedad y determinar el tratamiento antifúngico más adecuado.

Para la identificación microscópica de hongos, se emplearon tinciones especializadas, entre las cuales destacan:

Tinción de grocott (gomori-grocott): técnica de coloración utilizada para identificar hongos en muestras de tejido. su fundamento radica en la oxidación de polisacáridos presentes en la pared celular fúngica mediante ácido peryódico, seguido por la aplicación de una solución de sulfato de plata que reacciona para teñir de negro o marrón oscuro las estructuras fúngicas, como hifas y esporas, facilitando su observación microscópica diferenciándolas del tejido circundante que permanece claro o incoloro.

Tinción de Wright: Técnica empleada principalmente para observar células sanguíneas en muestras de sangre periférica o médula ósea. Utiliza eosina (colorante ácido) y azul de metileno (colorante básico) para teñir respectivamente citoplasmas y núcleos celulares. Los glóbulos rojos se tiñen de rosado a rojo, mientras que los leucocitos presentan núcleos de color morado o azul y citoplasmas de tonos rosados o grisáceos. Esta tinción permite detectar anomalías en células sanguíneas y evaluar la respuesta inmunitaria ante infecciones.

Blanco de Calcofluor: Colorante fluorescente que se une específicamente a polisacáridos como la quitina y β -glucanos de la pared celular fúngica. Bajo luz ultravioleta, emite fluorescencia azul o blanca, destacando estructuras fúngicas incluso en muestras con baja carga, lo que facilita la identificación rápida y precisa de hongos como Candida, Aspergillus y Fusarium.

Tinta China: Técnica de tinción negativa utilizada para detectar microorganismos encapsulados, especialmente útil en la identificación de Cryptococcus neoformans. La tinta no penetra las cápsulas, lo que produce un contraste oscuro en el fondo y deja una zona clara alrededor de la célula fúngica, permitiendo visualizar la cápsula como un halo alrededor del microorganismo.

KOH (Hidróxido de Potasio): Se emplea para la preparación de montajes directos de muestras clínicas (piel, uñas, cabello). El KOH disuelve las células epiteliales y otros materiales, pero no afecta la pared celular de los hongos, facilitando la visualización de hifas, esporas o levaduras al microscopio óptico.

Adicionalmente, en micología clínica se emplearon técnicas serológicas, como el **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**, con el objetivo de detectar antígenos o anticuerpos específicos contra hongos patógenos como *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus spp.*, *Pneumocystis jirovecii* y *Coccidioides immitis* en muestras de suero o LCR. Esta herramienta fue fundamental para el diagnóstico temprano y seguimiento de infecciones fúngicas sistémicas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. El procedimiento de la técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) inicia con la sensibilización de una placa de poliestireno, en la que se fijan los antígenos o anticuerpos específicos, dependiendo del tipo de ELISA utilizado (directo, indirecto, de captura o de competencia). Una vez fijado el componente de interés, se realiza un lavado para eliminar los residuos no adheridos. Posteriormente, se bloquean los sitios libres de la placa con una solución bloqueadora, generalmente a base de proteínas como la albúmina, para evitar uniones inespecíficas en los pasos siguientes.

Tras el bloqueo, se añade la muestra biológica (como suero, plasma u otros fluidos) que podría contener el analito a detectar. La placa se incuba a temperatura controlada durante un tiempo determinado, permitiendo que los anticuerpos o antígenos de la muestra se unan al componente inmovilizado en la placa. Luego se realiza una serie de lavados para eliminar los elementos no unidos.

Después, se añade un anticuerpo secundario conjugado con una enzima (como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina), que se une específicamente al analito o al complejo antígeno-anticuerpo. Una vez completada esta incubación, se lavan nuevamente los pocillos para eliminar el exceso del conjugado enzimático.

A continuación, se agrega el sustrato específico de la enzima; este reacciona con la enzima produciendo un cambio de color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra. Finalmente, se detiene la reacción mediante una solución de parada, y la absorbancia se mide en un lector de microplacas a una longitud de onda específica. Los resultados se interpretan

comparando la absorbancia de las muestras con los valores obtenidos de los controles o con una curva estándar.

Para el aislamiento y cultivo de hongos, se utilizaron diversos medios selectivos y diferenciales que favorecen el crecimiento fúngico y limitan el desarrollo bacteriano. Entre ellos destacan:

- **Agar Sabouraud:** Medio clásico para el cultivo de hongos, con un pH ácido que inhibe la mayoría de bacterias y favorece el crecimiento de mohos y levaduras.
- **Agar Dextrosa Sabouraud:** Variante del agar Sabouraud enriquecida con dextrosa, que proporciona una fuente de carbono para el crecimiento fúngico.
- **Mycosel:** Medio selectivo que contiene cicloheximida y cloranfenicol, inhibiendo bacterias y hongos contaminantes, ideal para el aislamiento de dermatofitos y otros hongos patógenos.
- **Agar Papa Dextrosa:** Medio nutritivo para hongos que promueve el desarrollo rápido y la formación de esporas, utilizado para la identificación de características morfológicas.
- **Cromoagar Candida:** Medio cromogénico diferencial que permite la identificación preliminar de especies de Candida basado en el color de las colonias, facilitando el diagnóstico rápido en muestras clínicas.

Cada medio tiene características específicas que permiten la diferenciación, identificación y aislamiento de los diversos hongos clínicamente relevantes.

Una vez obtenido el cultivo, la identificación se realizó mediante la observación macroscópica de las colonias y la observación microscópica de las estructuras reproductivas y vegetativas, además de pruebas bioquímicas, moleculares y serológicas. Es crucial también la determinación de la sensibilidad antifúngica por el método de Kirby-Bauer para orientar el tratamiento clínico.

Los antifúngicos utilizados para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas se clasifican en varios grupos según su mecanismo de acción:

- **Polienos (por ejemplo, Anfotericina B, Nistatina):** Actúan uniéndose al ergosterol de la membrana celular del hongo, formando poros que alteran la permeabilidad y provocan la muerte celular.
- **Azoles (como Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol):** Inhiben la síntesis de ergosterol mediante la inhibición de la enzima lanosterol 14 α -demethylasa, afectando la integridad de la membrana celular fúngica.
- **Equinocandinas (Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina):** Inhiben la síntesis de β -(1,3)-glucano, un componente esencial de la pared celular fúngica, debilitando la estructura y causando la lisis celular.
- **Otros antifúngicos:** Incluyen compuestos como 5-fluorocitosina (inhibe la síntesis de ácidos nucleicos), terbinafina (inhibe la enzima escualeno epoxidasa), y griseofulvina (interfiere con la mitosis fúngica).

AREA DE BIOLOGIA MOLECULAR

El área de Virología y Biología Molecular, es una sección esencial dentro del laboratorio clínico, ya que se especializa en la detección de virus respiratorios como influenza, SARS-CoV-2 y virus sincitial respiratorio (VSR), entre otros. A diferencia de otras áreas del laboratorio que trabajan con cultivos de bacterias u hongos, aquí se aplican técnicas moleculares que permiten identificar el material genético de los virus de forma rápida y precisa.

Las actividades desarrolladas incluyeron el procesamiento de muestras clínicas provenientes de pacientes con sospecha de infecciones respiratorias. Los principales virus detectados fueron: Influenza A y B, SARS-CoV-2 y virus sincitial respiratorio (VSR), entre otros. Para su identificación se utilizaron métodos automatizados de extracción y purificación de ácidos nucleicos, así como amplificación mediante PCR en tiempo real (qPCR).

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS

Se emplearon sistemas automatizados que utilizan tecnología basada en perlas magnéticas para la extracción de ácidos nucleicos. Este proceso consiste en la lisis del virus (mediante métodos químicos, mecánicos o combinados) para liberar su material genético (ARN o ADN), seguido de una etapa de purificación que elimina contaminantes como proteínas, lípidos y restos celulares. Bajo condiciones controladas, el material genético se adhiere a las perlas magnéticas, las impurezas son eliminadas a través de lavados sucesivos, y posteriormente los ácidos nucleicos son eluidos para su posterior análisis.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Posterior a la extracción, las muestras se sometieron a amplificación mediante la técnica de PCR. En el caso de los virus respiratorios que contienen ARN, se utilizó la variante RT-PCR (Transcripción Reversa seguida de PCR), donde el ARN viral es retrotranscrito a ADN complementario (cDNA), el cual posteriormente es amplificado. La PCR fue realizada tanto manualmente como mediante sistemas automatizados como GeneXpert, el cual integra los pasos de amplificación y detección en un solo cartucho, proporcionando resultados en aproximadamente 90 minutos.

En esta técnica, los ciclos térmicos constan de tres etapas: desnaturalización del ADN, alineamiento de los primers con la secuencia blanco, y extensión de la nueva hebra por acción de la ADN polimerasa. En el caso de la qPCR, se utilizaron sondas fluorescentes que permiten detectar y cuantificar el material genético amplificado en tiempo real.

DETECCIÓN MEDIANTE SISTEMAS MULTIPLEX

Adicionalmente, se empleó el sistema automatizado FilmArray, el cual permite la identificación simultánea de múltiples patógenos a partir de una sola muestra. Este sistema se utilizó para realizar paneles respiratorios y de meningitis/encefalitis. El panel respiratorio incluye la detección de virus como Influenza A (y sus subtipos H1,

H3, H1-2009), Influenza B, VSR, rinovirus, coronavirus humanos, adenovirus, metapneumovirus, y bacterias como ***Mycoplasma pneumoniae***, ***Chlamydia pneumoniae*** y ***Bordetella pertussis***. El panel de meningitis/encefalitis incluye patógenos como ***Neisseria meningitidis***, ***Listeria monocytogenes***, ***Escherichia coli K1***, ***Cryptococcus neoformans/gattii*** y varios herpesvirus.

PROCESAMIENTO SEMI-AUTOMATIZADO

En ciertos casos, como la detección de subtipos de influenza o de hongos como ***Aspergillus spp.***, se realizaron procedimientos semi-automatizados. Tras la extracción automatizada de los ácidos nucleicos, se preparó manualmente la mezcla para PCR, añadiendo los componentes necesarios: enzima polimerasa, primers específicos, dNTPs, iones de magnesio, agua libre de nucleasas, y en caso de qPCR, sondas fluorescentes. Las reacciones fueron llevadas a cabo en termocicladores, que controlan de forma automatizada los ciclos de temperatura necesarios para la amplificación.

4. ACTIVIDADES REALIZADAS

Durante mi servicio social en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, llevé a cabo diversas funciones en el Laboratorio de Microbiología Clínica, con el propósito de brindar apoyo en los procesos de análisis microbiológico de muestras biológicas provenientes de los pacientes atendidos en esta institución.

AREA DE RECEPCIÓN

- Recepción y registro de muestras clínicas.
- Aplicación de normas de bioseguridad.
- Toma de exudados nasofaríngeos

AREA DE BACTERIOLOGÍA

- Siembra e incubación de cultivos bacterianos.
- Realización de tinciones de Gram.
- Pruebas bioquímicas para identificación bacteriana.
- Observación microscópica de muestras.

AREA DE MICOLOGÍA

- Procesamiento de muestras para diagnóstico fúngico.
- Siembra y observación de colonias micóticas.
- Tinciones y análisis morfológico de hongos.
- Apoyo en la identificación preliminar de especies.

AREA DE BIOLOGIA MOLECULAR

- Preparación de muestras para extracción de ADN/ARN.

- Montaje de PCR convencional.
- Apoyo en documentación de resultados moleculares.
- Observación de procesos de análisis genético.

5. METAS ALCANZADAS

Se logró cumplir exitosamente con los objetivos planteados al inicio del proyecto.

1. **Supervisar y verificar la correcta recepción de muestras clínicas, asegurando que cumplan con los criterios de calidad y condiciones de transporte requeridas, así como colaborar en la toma de muestras de hisopado y sangre.**

Este objetivo se cumplió mediante la participación activa en la recepción diaria de muestras provenientes de diversas áreas del hospital y hospitales externos. Se verificó que cada una estuviera correctamente rotulada, dentro del tiempo de viabilidad y conservada en condiciones adecuadas según el tipo de análisis. Además, se colaboró en la toma de muestras de hisopado nasofaríngeo y de sangre, siguiendo estrictamente los protocolos establecidos para garantizar la calidad del material biológico.

2. **Emplear técnicas microbiológicas convencionales, incluyendo la siembra en medios de cultivo y la realización de tinciones diferenciales, con fines diagnósticos.**

Durante el servicio social se aplicaron de manera constante técnicas de siembra en medios selectivos, diferenciales y enriquecidos, con el propósito de aislar y favorecer el crecimiento de microorganismos patógenos. Asimismo, se realizaron tinciones diferenciales como Gram y Ziehl-Neelsen, esenciales para la clasificación y diagnóstico bacteriano, siguiendo criterios clínicos y microbiológicos establecidos.

3. **Ejecutar pruebas bioquímicas convencionales y automatizadas, así como utilizar equipos especializados para la identificación precisa de**

bacterias y la elaboración de perfiles de sensibilidad antimicrobiana mediante antibiogramas.

Este objetivo se logró al ejecutar pruebas bioquímicas como la oxidasa, catalasa, coagulasa, ureasa y la utilización de sistemas automatizados como VITEK® y Maldi-TOF, que permitieron identificar microorganismos a nivel de especie. Además, se elaboraron perfiles de sensibilidad a antimicrobianos mediante pruebas de difusión en disco y tiras de E-test para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

4. Procesar muestras micológicas mediante cultivo e identificación, y aplicar pruebas inmunológicas como ELISA para la detección de antígenos o anticuerpos fúngicos.

Se procesaron muestras clínicas sospechosas de micosis mediante cultivo en medios especializados como Sabouraud, Mycosel, Cromoagar Candida y agar papa dextrosa, favoreciendo el aislamiento e identificación de hongos. Asimismo, se aplicaron pruebas inmunológicas como ELISA para la detección de antígenos de Histoplasma capsulatum, Cryptococcus neoformans y Aspergillus spp., contribuyendo a diagnósticos oportunos y certeros.

5. Colaborar en la aplicación de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección de ácidos nucleicos de microorganismos patógenos de importancia clínica.

Se participó en la preparación de muestras para PCR, desde la extracción de ácidos nucleicos hasta la amplificación específica de genes microbianos. Esta técnica fue clave para la detección de patógenos como Mycobacterium tuberculosis y Pneumocystis jirovecii, entre otros, permitiendo una identificación precisa incluso en casos donde otras metodologías presentaban resultados negativos.

6. Cumplir rigurosamente con las normas de bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio durante la manipulación, análisis y disposición de muestras infecciosas.

A lo largo del servicio social se mantuvo una estricta observancia de las normas de bioseguridad del laboratorio de microbiología clínica, utilizando equipo de protección personal, cabinas de bioseguridad clase II, y cumpliendo con la correcta disposición de residuos biológicos peligrosos. Estas acciones aseguraron la protección del personal y la integridad de las muestras procesadas.

6. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Durante el periodo de servicio social en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), se logró participar activamente en el diagnóstico microbiológico de enfermedades infecciosas mediante el procesamiento y análisis de diversas muestras clínicas. Se recibieron y validaron muestras como esputo, lavado broncoalveolar, hemocultivos, hisopados y sueros, cumpliendo con los criterios de calidad y condiciones de conservación establecidas.

Se aplicaron técnicas microbiológicas convencionales como la siembra en medios de cultivo (agar sangre, agar chocolate, agar MacConkey, Sabouraud, Mycosel, Cromoagar Candida, entre otros), así como tinciones diferenciales (Gram, Ziehl-Neelsen, Grocott, Wright, Blanco de Calcofluor y tinta china), las cuales permitieron observar estructuras características y orientar el diagnóstico.

En el área de bacteriología, se ejecutaron pruebas bioquímicas manuales y automatizadas para la identificación de bacterias, complementadas con la realización de antibiogramas para determinar perfiles de sensibilidad. En micología, se cultivaron y analizaron hongos patógenos, y se aplicaron pruebas inmunológicas como ELISA para la detección de antígenos específicos de ***Histoplasma capsulatum***, ***Cryptococcus neoformans***, ***Aspergillus spp.***, entre otros. Asimismo, se participó en la ejecución de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permitiendo la detección de material genético fúngico y bacteriano en casos de difícil diagnóstico.

Todas estas actividades se desarrollaron bajo estrictas normas de bioseguridad y buenas prácticas de laboratorio, asegurando la integridad del personal, la validez de los resultados y la confiabilidad del diagnóstico clínico.

El desarrollo del servicio social permitió aplicar y fortalecer los conocimientos teórico-prácticos en microbiología clínica, al participar de manera integral en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en pacientes del INER. La identificación precisa de microorganismos mediante técnicas microbiológicas e inmunológicas

resultó fundamental para establecer diagnósticos oportunos y orientar tratamientos adecuados, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

Se cumplió exitosamente con cada uno de los objetivos planteados, incluyendo la recepción y procesamiento de muestras clínicas, la aplicación de metodologías convencionales y moleculares, así como la observancia rigurosa de normas de bioseguridad.

7. RECOMENDACIONES Y APOORTE A LA SOCIEDAD

Durante mi servicio social en el área de microbiología clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), contribuí a la sociedad al participar activamente en el diagnóstico y control de enfermedades infecciosas respiratorias que afectan a la población. A través del manejo de técnicas especializadas, como siembras microbiológicas, tinciones diferenciales, pruebas inmunológicas y métodos de biología molecular, colaboré en la identificación rápida y precisa de agentes patógenos. Esta labor facilitó la selección de tratamientos adecuados y, por ende, mejoró la atención médica brindada a los pacientes. De este modo, mi participación no solo apoyó directamente el bienestar de individuos con cuadros clínicos complejos, sino que también aportó al fortalecimiento de las estrategias de prevención y control de enfermedades respiratorias en el ámbito hospitalario y comunitario.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. (s.f.). **Investigación en microbiología.** Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud%7Ciner/articulos/investigacion-en-microbiologia>
- Morales-García, M. A., & Escobar-Gutiérrez, A. (2014). **Diagnóstico microbiológico de infecciones respiratorias: nuevos enfoques y retos actuales.** Investigación en Discapacidad, 3(1), 5–12. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- CliniSciences. (s.f.). **Pruebas serológicas en micología.** <https://www.clinisciences.com/es/leer/pruebas-serologicas-en-micologia-1190.html>
- Taborda, C. P., & Nosanchuk, J. D. (2020). Micología médica: retos y perspectivas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** 62, e43. <https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/HJzkRHS49YY6Xh75SPNcPsm/?lang=es>