
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Informe de conclusión del Servicio Social
por Actividades Relacionadas con la Profesión

**Detección de microorganismos patógenos asociados a
enfermedades infecciosas de pacientes atendidos en el INER**

Que presenta el Alumno

Leonardo Alonso Ramírez

2202035730

ASESORA INTERNA

ASESOR EXTERNO

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

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

Ciudad de México, febrero de 2025

Lugar de realización

El lugar donde se realizará el servicio social por el alumno será en el Laboratorio de Microbiología Clínica se encuentra en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” al sur de la Ciudad de México, en la zona de hospitales sobre Calz. de Tlalpan No. 4502, en la colonia Belisario Domínguez Secc 16, delegación Tlalpan, CP: 14080.

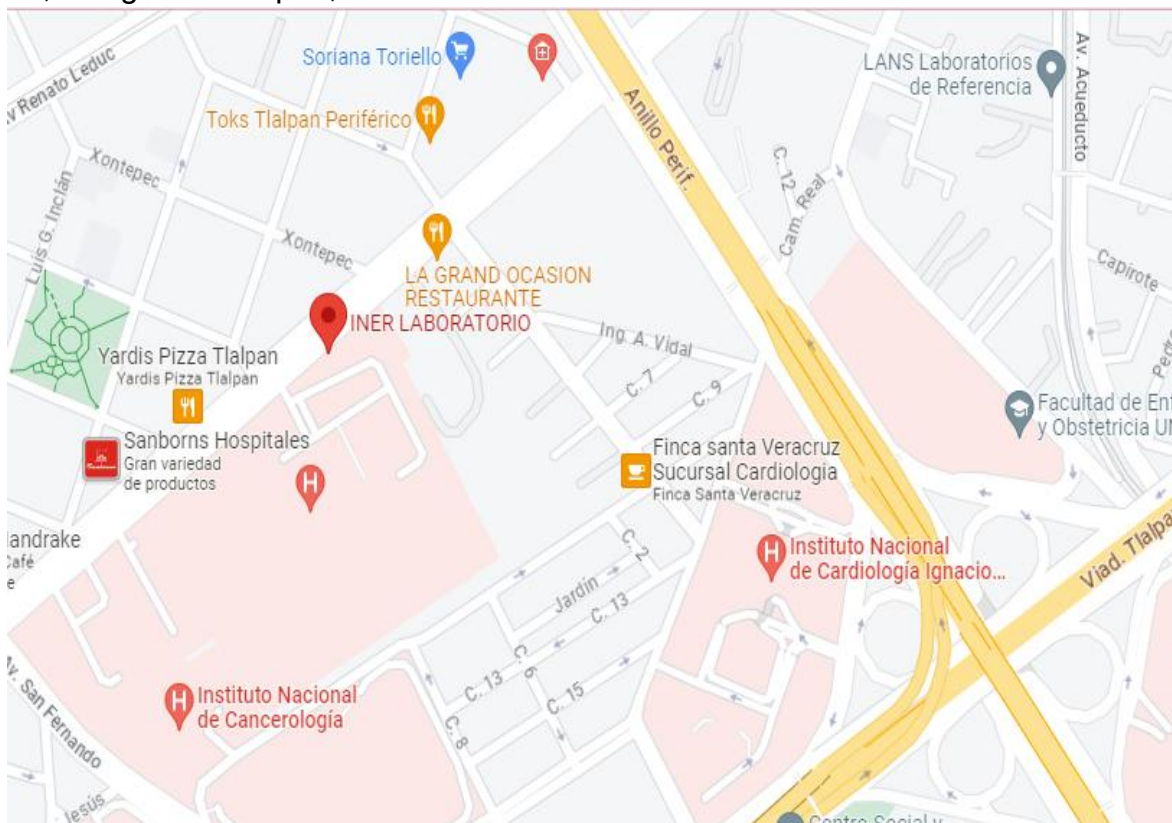


Figura 1. Ubicación del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Justificación

Las actividades a realizar en el Laboratorio de Microbiología Clínica del INER están muy relacionadas con lo aprendido en las unidades "Prevención y Control de la Propagación Microbiana" y "Obtención de Metabolitos de Interés Farmacéutico", ya que se realizan actividades como la siembra e identificación de microorganismos patógenos, ya sea por medio de técnicas de identificación macroscópicas, como la observación de los tipos de colonias; microscópicas, como observación a través del microscopio; y técnicas moleculares como PCR.

Aporte a la sociedad

El servicio social realizado en el Laboratorio de Microbiología Clínica del INER representó una contribución significativa a la sociedad, al participar en actividades que impactan de manera directa en la salud pública. Las tareas desempeñadas, como la recepción, procesamiento y análisis de muestras clínicas de pacientes con sospecha de enfermedades infecciosas, así como el apoyo en la realización de estudios bacteriológicos, micológicos y moleculares, contribuyeron a garantizar diagnósticos oportunos y precisos.

Esta labor permitió facilitar al personal médico la toma de decisiones fundamentadas para la instauración de tratamientos adecuados, el control de infecciones hospitalarias y la prevención de brotes, aspectos esenciales en una institución de alta especialidad como el INER. De este modo, el servicio social apoyó indirectamente en la mejora de la calidad de atención a los pacientes y en la protección de la salud del personal hospitalario y de la comunidad en general, reforzando la vigilancia epidemiológica y el uso racional de recursos diagnósticos y terapéuticos.

Marco Institucional

Historia

En el año de 1936, en vigencia de la presidencia del General Lázaro Cárdenas fue fundado el INER bajo el nombre de Sanatorio para Enfermos Tuberculosos de Huipulco que contaba con maestros que vinculaban la enseñanza a la sociedad y cultura (INER, 2017) siendo además el primer sanatorio para tuberculosos ya que en México en 1930 era la octava causa de muerte por lo que había una necesidad urgente por obtener un lugar propicio para su construcción (Pérez, 2011).

Los primeros pacientes ingresaron el 16 de marzo de 1936 recibiendo todas las atenciones pertinentes para su recuperación y siendo aislados para así también mantener fuera de riesgo a la comunidad. El Dr. Donato G. Alarcón Martínez, sentó las bases de los cuidados respiratorios en México, fue el primer presidente del Comité Nacional de Lucha contra la Tuberculosis además del primer presidente de la Sociedad Mexicana de Tuberculosis (ahora de Neumología y Cirugía de Tórax) y el primer editor de su revista que hoy en día sigue vigente (Pérez, 2011).

En 1969 cambio nuevamente su nombre a Hospital para Enfermedades Pulmonares de Huipulco dando más lugar a pacientes con otros tipos de enfermedades pulmonares. Para 1975 se convierte en el Instituto Nacional de Enfermedades Pulmonares que además de contar con enseñanza y asistencia médica, integra la investigación científica y técnica en la especialidad de neumología (INER, 2017).

Ya en el año de 1982 basado en el decreto del 14 de enero del presidente municipal se crea el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, como un organismo descentralizado del Gobierno Federal, así como con personalidad jurídica y patrimonio propio (INER, 2017).

Misión

Mejorar la salud respiratoria de los individuos y las comunidades a través de la investigación, la formación de recursos humanos y la atención médica especializada

Visión

El INER debe ser la entidad nacional normativa en salud respiratoria y el principal sitio de enseñanza, investigación, promoción y atención de alta especialidad, con competitividad nacional e internacional.

Objetivo del proyecto social

Participar activamente y brindar apoyo en las distintas áreas del laboratorio de microbiología clínica del INER, con el propósito de contribuir a los procesos de diagnóstico de agentes infecciosos de importancia clínica y fortalecer los conocimientos teórico-prácticos adquiridos durante la formación profesional.

Fundamento de las actividades

La microbiología es el estudio de los microorganismos, que son un grupo grande y diverso de organismos microscópicos que viven en forma de células aisladas o en grupos de células (Brooks et al., 2005). Los microorganismos, son seres microscópicos que individualmente son difíciles de observar a simple vista. En este grupo encontramos bacterias, hongos (levaduras y mohos [hongos filamentosos]), los protozoos y las algas microscópicas. También se incluyen los virus, entidades que se consideran en el límite entre lo vivo y lo inerte (Tortora et al., 2007).

Los microorganismos influyen ampliamente en la vida cotidiana, son los ladrillos que constituyen tanto de manera física como química en nuestro planeta. Influyen en los ciclos biogeoquímicos que son fundamentales para que se lleve a cabo la vida, además de que llevan a cabo una función importante que es la fotosíntesis y que van a constituir el 90% de la biomasa en la biosfera. Dentro de nosotros, más del 90% de células en nuestro cuerpo está constituido de microbios con los cuales mantenemos amplias relaciones (Brooks et al., 2005).

El laboratorio de microbiología tiene como primera instancia llevar a cabo las determinaciones microbiológicas o parasitológicas sobre muestras humanas, así como el diagnóstico, evolución y tratamiento de las enfermedades (Alados, et al., 2010). También se encarga de identificar los microorganismos causantes de enfermedades en base a diferentes pruebas que les permitan identificar la incidencia, la resistencia, etc., (Friedman & Newsom, 2011).

Pérez (2010) mencionan que las enfermedades respiratorias pueden verse en aumento debido a el envejecimiento, hábitos sedentarios, mala alimentación, estrés, respiración de aire impuro como el de contaminación ambiental. Sin embargo, en el INER se mantiene el compromiso por atender estas enfermedades además del

desarrollo de investigaciones de la mano con los diferentes departamentos como el laboratorio de microbiología clínica.

Por lo anterior, el objetivo del presente servicio social se centra en apoyar de manera general en las actividades/trabajo del Laboratorio de Microbiología Clínica en sus diferentes áreas.

Plan de trabajo

Plan de trabajo del 05 de agosto del 2024 al 07 de febrero del 2025:

5 agosto – 04 octubre.

1. El servicio social iniciará el 05 de agosto del 2024, durante este periodo se el alumno estará en una capacitación de introducción general a los procesos que se realizan en el laboratorio de microbiología clínica, así como las medidas de bioseguridad que debe de seguir, obtendrá una capacitación del proceso integral para el diagnóstico de microorganismos de interés médico, así como de la importancia clínica de cada proceso.
2. El alumno se integrará al área de recepción y siembra de muestras biológicas, en donde aprenderá el proceso inicial que reciben las muestras de pacientes con sospecha de enfermedades infecciosas para la búsqueda de microorganismos de interés médico.
 - 2.1 Se capacitará para llevar a cabo la aplicación de criterios para valoración y aceptación de muestras clínicas.
 - 2.2 Manejo de muestras clínicas y su pretratamiento e inoculación en medios de cultivo, así como el fundamento de los mismos.
 - 2.3 Métodos de aislamiento bacteriano para cultivos cualitativos y cuantitativos de muestras clínica.
 - 2.4 Aprenderá la realización y lectura de tinciones microbiológicas de Gram, Ziehl-Nielsen, y de sedimentos urinarios para la búsqueda de microorganismos patógenos mediante microscopía, así como la importancia y fundamentos de las mismas.
 - 2.5 Procesamiento de paneles moleculares mediante el sistema Film Array para estudios de urgencia.
 - 2.6 Presentación de informe de actividades.

07 octubre – 15 noviembre.

3. El alumno se integrará al área de bacteriología en donde aprenderá el proceso integral de para la identificación de bacterias de interés médico, así como el manejo adecuado de cultivos bacterianos.
 - 3.1 Los procesos de cultivo y aislamiento de bacterias de interés médico en los diferentes medios de cultivo.
 - 3.2 Observará la morfología microscópica y colonial de bacterias.

- 3.3 Realizará pruebas bioquímicas para la identificación presuntiva de bacterias, así como los fundamentos y mecanismos de acción de las mismas.
- 3.4 Realizará la preparación de cultivos bacterianos para su identificación,
- 3.5 Aprenderá el uso de los sistemas automatizados VITEK y MALDI-TOF para la identificación de bacterias de interés médico.
- 3.6 Realizará pruebas de susceptibilidad a fármacos antimicrobianos, así como la interpretación de estos.
- 3.7 Presentación de informe de actividades y discusión de artículo científico.

18 noviembre – 31 diciembre.

- 4. El alumno se integrará al área de micología en donde aprenderá y desarrollará el proceso integral para la búsqueda de hongos y levaduras de interés médico.
 - 4.1 Procesos de cultivos y aislamiento de hongos y levaduras en los diferentes medios de cultivo.
 - 4.2 Observará la morfología microscópica y colonial de hongos, así como su descripción.
 - 4.3 Realizará tinciones microbiológicas para la observación de estructuras fúngicas y levaduras, como la tinción de Grocott, Wright, tinta china, azul de lactofenol, e inmunofluorescencia para observación de *Pneumocystis jirovecii*.
 - 4.4 Realizará la preparación de cultivos fúngicos para su identificación,
 - 4.5 Aprenderá el uso de los sistemas automatizados VITEK y MALDI-TOF para la identificación de hongos de interés médico.
 - 4.6 Realizará pruebas de susceptibilidad a fármacos antifúngicos, así como la interpretación de los mismos.
 - 4.7 Se involucrará en la realización de pruebas inmunoenzimáticas tipo ELISA para la determinación de antígenos y anticuerpos fúngicos.
 - 4.8 Presentación de informe de actividades y discusión de artículo científico.

02 enero – 07 febrero 2025.

- 5. El alumno se integrará al área de Biología Molecular y Virología en donde aprenderá y desarrollará los procesos moleculares para la detección de virus respiratorios asociados a infecciones respiratorias agudas.
 - 5.1 Procesos de extracción de ácidos nucleicos de forma automatizada empleando diversas técnicas y plataformas a partir de muestras de exudados nasofaríngeos.
 - 5.2 Procesos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando diferentes kits comerciales para la amplificación de ácidos nucleicos virales y bacterianos.
 - 5.3 Interpretación de curvas de amplificación de PCR para la detección de virus y bacterias respiratorias.
 - 5.4 Presentación de informe de actividades y discusión de artículo científico.

6. Durante todo el periodo de servicio social, el alumno se involucrará en los protocolos establecidos para el trabajo del laboratorio, la preparación de los materiales necesarios para el desarrollo de estos protocolos, el alumno asistirá a las sesiones de del curso de microbiología general impartidas por el tutor en la escuela de formación técnica del INER, así como a las sesiones de microbiología internas del laboratorio, el alumno también deberá realizar un informa de actividades por cada área de trabajo en la cual estuvo rotando.

Cronograma de actividades

Actividades	2024-2025						
	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero
Área de recepción de muestras y Siembras							
Laboratorio de Bacteriología. Aislamiento y análisis de bacterias de interés médico							
Laboratorio de Micología. Aislamiento y análisis de hongos de interés médico							
Laboratorio de Biología Molecular y Virología. Detección de virus respiratorios y bacterias atípicas mediante PCR.							

Tabla 1. Cronograma de actividades

Resultados del servicio social: actividades desarrolladas

Área de recepción y siembra de muestras

El área de recepción es el primer filtro en el que pasan las muestras biológicas para que se lleve a cabo un correcto procesamiento de las mismas, son indispensables ciertas características para evitar rechazos o un retraso en el procesamiento de las muestras.

En el laboratorio de microbiología clínica del INER se procesan muestras de todo tipo, como son:

- Expectoración
- Lavado bronquioalveolar
- Aspirado bronquial
- Líquido cefalorraquídeo
- Líquido pleural
- Hemocultivo
- Mielocultivo
- Heces (solo muestras diarreicas)
- Orina
- Abscesos (aspirados por punción en jeringa o inoculados en frasco)
- Secreciones de heridas quirúrgicas
- Biopsias
- Punta de catéter
- Exudado nasal
- Exudado faríngeo
- Exudado nasofaríngeo
- Jugo gástrico
- Suero
- Sangre total (tubo de heparina de litio)

Todas estas muestras requieren de condiciones para ser aceptadas y procesadas por el laboratorio. Es indispensable que las muestras tengan un etiquetado con los datos del paciente, principalmente el nombre completo. Cada muestra debe venir acompañada de una hoja, la cual es la orden del médico correspondiente para la realización de los estudios de laboratorio. Pueden provenir de médicos del INER o de otros hospitales o instituciones con las que el instituto tiene convenio. Si la orden viene de algún médico del INER, esta debe contener los datos del paciente, como el nombre, fecha de nacimiento, edad, servicio (área de cual proviene), diagnóstico del paciente, observaciones, los estudios solicitados con sus claves en forma de lista y el nombre, firma y cédula del médico solicitante. Si la orden es de algún médico de otro hospital o institución en convenio, la orden debe contener datos del paciente, nombre, fecha de nacimiento, edad, nombre del hospital que proviene, un resumen del expediente clínico del paciente, los estudios solicitados y nombre, firma y cédula del médico solicitante, además de esta orden, en el área de recepción se debe llenar una solicitud de estudios donde tienen que escribir fecha de la solicitud, nombre del paciente, fecha de nacimiento, edad, género, diagnóstico, hospital o

institución proveniente y se deben seleccionar los estudios que solicitan; esta solicitud también debe de contener un sello del área de convenios del INER que autoriza que se puedan realizar los estudios en esta institución.

Si las muestras recibidas cuentan con las condiciones antes mencionadas y su respectiva solicitud, el área de recepción acepta las muestras para llevar a cabo su registro y procesamiento.

Aceptación y procesamiento de muestras

Para ser aceptadas y procesadas, algunas muestras deben de cumplir con ciertas características dependiendo del estudio al que vayan dirigidas. Es importante mencionar que, si así se requiere en la solicitud, las muestras pueden ir dirigidas a otras áreas del laboratorio, es por esto que el personal del área de siembras también debe separar las alícuotas correspondientes a cada área a la que se desea enviar.

Expectoración (EXP).

Cultivo de bacterias: Si a una expectoración se le necesita realizar un cultivo de bacterias, esta debe contar con algunas características macroscópicas para ser aceptada, una es que no debe contener restos de alimentos, es por esto que se les pide a los pacientes que antes de expectorar se enjuaguen la boca con abundante agua, también es importante que las expectoraciones no cuenten con saliva, debido a que la muestra debe pasar por una valoración microscópica en donde se deben de cumplir con los criterios de Murray-Washington (1975), los cuales establecen que para que un esputo sea de calidad aceptable para su cultivo la muestra debe contener: > 25 leucocitos/campo de 100X y < 10 células epiteliales escamosas/campo de 100X, esto se puede observar gracias a una tinción de Gram (Cacho et al., 2007). Si la muestra cumple con estos criterios será sembrada en medios de cultivo agar gelosa sangre, agar gelosa chocolate y agar MacConkey con técnica de estriado en cuadrantes para el aislamiento de bacterias respiratorias comunes. Posteriormente la muestra cultivada en sangre y chocolate es llevada a incubación en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas y el cultivo en MacConkey a incubación a 37°C durante 24-48 horas.

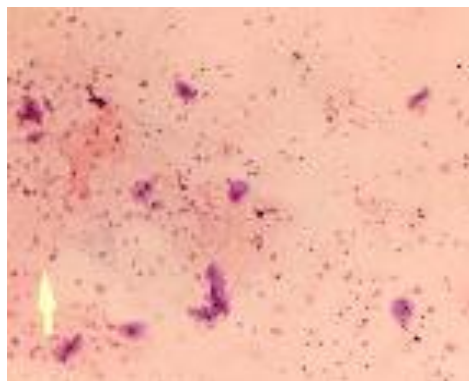


Figura 2. Tinción de Gram de muestra de esputo rechazada por gran cantidad de células epiteliales escamosas.

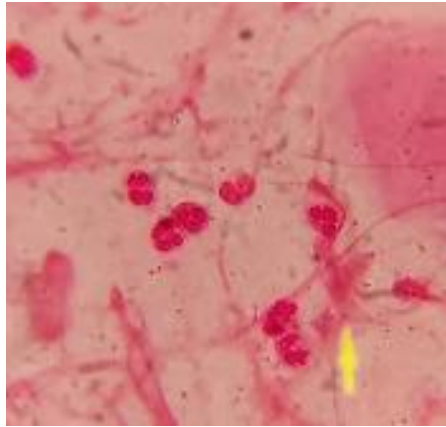


Figura 3. Tinción de Gram de muestra de esputo con múltiples leucocitos.

GeneXpert MTB/RIF: Si el médico solicita, también se puede realizar en el área de siembras un estudio que consiste en preparar la muestra para un equipo llamado GeneXpert, para tuberculosis, el cual consiste en una PCR en tiempo real para detectar ADN de *Mycobacterium tuberculosis* y mutaciones asociadas a resistencia a la rifampicina. La preparación de la muestra consiste en añadir al esputo un buffer de lisis que viene incluido con los cartuchos del equipo y posteriormente cargar un cartucho, todo esto se debe realizar con equipo de protección personal y en una cabina de bioseguridad, por último, el cartucho se introduce al equipo y se obtiene el resultado en un tiempo de aproximadamente 2 horas.

Lavado bronquioalveolar (LBA).

La obtención de este tipo de muestra es realizada por el personal médico y se trata de una broncoscopia, la cual es un método complejo y muy invasivo en el que los pacientes sufren demasiado, es por esto que este tipo de muestra siempre debe ser aceptada por el laboratorio para ser procesada.

Cultivo de bacterias: Para el cultivo de bacterias de un lavado bronquioalveolar se necesita sembrar en 3 medios de cultivo que son agar gelosa sangre, agar gelosa chocolate y agar MacConkey, con técnicas diferentes, en agar gelosa chocolate se siembra la muestra directa y se requiere de técnica de estriado radial la cual es una técnica cuantitativa y se hablará más a fondo sobre esta técnica en la sección de bacteriología; en agar gelosa sangre y MacConkey la muestra se siembra concentrada, es decir, la muestra debe pasar por un proceso de centrifugación para extraer el exceso de líquido (solución salina) de la muestra, y se utiliza técnica de estriado en cuadrantes. Posteriormente la muestra cultivada en sangre y chocolate es llevada a incubación en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas y el cultivo en MacConkey a incubación a 37°C durante 24-48 horas. Se incluye en el cultivo la realización de frotis para tinción de Gram y tinción Ziehl-Neelsen (ZN) que también se realizan de la muestra concentrada. Con las tinciones se buscan microorganismos que puedan estar causando enfermedades y la observación de estos a microscopio ayuda con la interpretación en la observación de colonias de

crecimiento en los medios de cultivo, que son observadas en las áreas de bacteriología y hongos (**figura 4**).

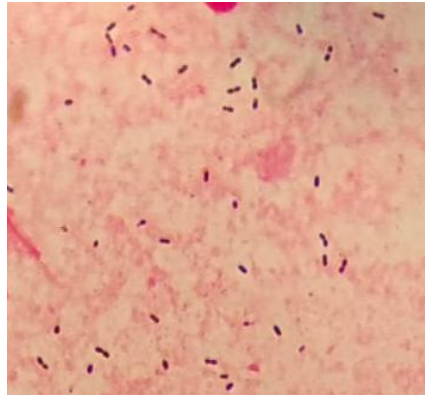


Figura 4. Tinción de Gram de muestra de LBA con múltiples estreptococos.

Aspirado bronquial (AB).

Cultivo de bacterias: Para el cultivo de un aspirado bronquial se requiere una valoración microscópica previa a través de una tinción de Gram para observar la presencia de células epiteliales escamosas, si el frotis observado cuenta con más de 10 células por campo la muestra debe ser rechazada, si cuenta con menos de 10 células por campo la muestra es aceptada y procesada exactamente igual que el lavado bronquioalveolar. También se incluye tinción de Ziehl-Neelsen para la observación de micobacterias (**figura 5**).

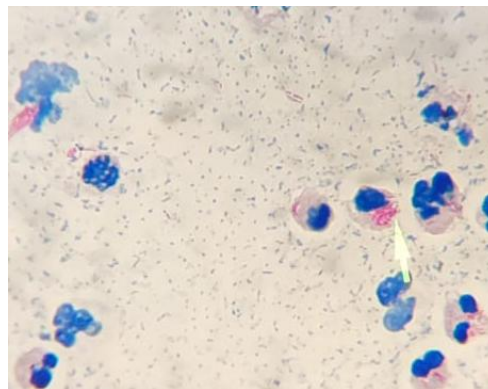


Figura 5. Tinción de Ziehl-Neelsen positiva en una muestra de Aspirado bronquial. Se observan micobacterias dentro y fuera de leucocitos.

Líquido cefalorraquídeo (LCR).

Al igual que con el lavado bronquioalveolar, la obtención de este tipo de muestra es un método sumamente invasivo, en este caso el LCR es tomado por los médicos mediante el método de punción lumbar, por lo que los criterios de rechazo deben reducirse al máximo (Codina et al., 2011). La muestra debe venir en tubos estériles, bien sellados y con un correcto etiquetado.

Cultivo de bacterias: Para el cultivo de LCR deben emplearse medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre por técnica de estriado en cuadrantes, las condiciones de incubación en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas, también se emplea agar MacConkey con técnica de estriado en cuadrantes y condiciones de incubación a 37°C durante 24-48 horas. Además, se inoculará 1 mL de la muestra en una botella de hemocultivo aeróbico pediátrico y se coloca en equipo de incubación para hemocultivos BD BATEC durante 7 días. El cultivo también incluye la realización de tinción de Gram y tinción ZN.

Líquido pleural (LP).

Cultivo de bacterias: Para el cultivo de LP se emplean medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre por técnica de estriado en cuadrantes, las condiciones de incubación en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas, también se emplea agar MacConkey con técnica de estriado en cuadrantes y condiciones de incubación a 37°C durante 24-48 horas. También se incluye la realización de tinción de Gram y tinción ZN.

Otros líquidos corporales (ascitis, sinovial, pericárdico, peritoneal, diálisis, timpanocentesis).

Cultivo de bacterias: para el cultivo de otros líquidos corporales la muestra debe pasar por una previa centrifugación para desechar el exceso de líquido y la muestra quede concentrada para su posterior sembrado en medios de cultivo como agar chocolate y agar sangre por técnica de estriado en cuadrantes, las condiciones de incubación en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas, también se emplea agar MacConkey con técnica de estriado en cuadrantes y condiciones de incubación a 37°C durante 24-48 horas. También se incluye la realización de tinción de Gram y tinción ZN.

Hemocultivo

Para procesar un hemocultivo deben presentarse tres frascos de cultivo (aerobios y anaerobios) correctamente etiquetados con los datos del paciente y con la muestra ya inoculada, este proceso es realizado por personal médico debido a que es un método invasivo mediante venopunción. Uno de los frascos debe ser por extracción a través de catéter y los otros dos deben ser por extracción periférica (derecha e izquierda) (Rodríguez et al., 2017).

Los frascos de hemocultivo deben ser registrados y después introducidos en un equipo de incubación para hemocultivos BD BACTEC de 7 a 21 días.

Mielocultivo

Para procesar un Mielocultivo debe presentarse casi lo mismo que con el hemocultivo, tres frascos de cultivo, además de dos tubos de medio de cultivo agar Sabouraud y Mycosel, y portaobjetos para hacer diferentes tinciones según requiera

el médico, todo esto debe venir inoculado con la muestra, la extracción de la muestra es por método de punción de médula ósea, normalmente del hueso pélvico o del esternón, dicho procedimiento es realizado por el personal médico (Biblioteca Nacional de los Estados Unidos [NLM], 2023).

Los frascos de mielocultivo deben ser registrados y después introducidos en un equipo de incubación para hemocultivos BD BACTEC de 7 a 21 días.

Los medios de cultivo Sabouraud y Mycosel deben ser llevados al área de hongos y dejar a incubación con atmosfera de O₂ a temperatura ambiente durante 30 días. Los portaobjetos, dependiendo la tinción que se requiere, se procesan para tinción de Gram y ZN, y si se requiere tinción de Grocott o de Wright se envían al área de hongos.

Heces (solo muestras diarreicas)

Las muestras fecales deben presentarse en un frasco estéril de boca ancha y tapón de rosca con el correcto etiquetado.

Cultivo de bacterias: el cultivo de heces se realiza en 4 medios de cultivo diferentes los cuales son agar MacConkey, agar Salmonella Shigella, agar Verde brillante y caldo Tetratonato, la técnica de estriado en los agares es por cuadrantes y en el caldo se deposita 1mL aproximadamente de la muestra en el fondo del tubo. Se debe incubar todo a 37°C durante cuatro horas y después se deben inocular otros tres agares MacConkey, Salmonella Shigella y Verde brillante con la muestra inoculada en el caldo Tetratonato; esto se realiza porque las enterobacterias que pueden crecer en estos agares necesitan mayores requerimientos nutricionales y el caldo Tetratonato además de inhibir el crecimiento de otras bacterias competidoras (como *E. coli*) es un medio enriquecido y va a permitir que el crecimiento de las bacterias patógenas sea más detectable (Álvarez et al., 2008), de igual manera estos cultivos se incuban a 37°C sin embargo, ya es en un lapso de 24 a 48 horas.

Orina

Para la recepción de la muestra se requiere que la orina debe provenir de la micción media de la primera orina de la mañana, con previo aseo de genitales, o también puede ser obtenida directamente de la vejiga por sondaje vesical, las muestras deben presentarse en un frasco estéril de boca ancha y tapón de rosca con el correcto etiquetado.

Cultivo de bacterias: para un urocultivo la muestra debe ser sembrada en los medios de cultivo agar MacConkey por técnica de estriado en cuadrantes y en agar Sangre de manera cuantitativa por técnica de estriado radial. Después la muestra se centrifuga para tener la muestra concentrada y a partir de este sedimento se realiza una observación microscópica a 40X para la identificación de algún microorganismo patógeno.

Abscesos (aspirados por punción en jeringa)

Cultivo de bacterias: Para el cultivo de abscesos se emplean medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre por técnica de estriado en cuadrantes, las condiciones de incubación en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas, también se emplea agar MacConkey con técnica de estriado en cuadrantes y condiciones de incubación a 37°C durante 24-48 horas. También se incluye la realización de tinción de Gram y tinción ZN.

Secreciones de heridas quirúrgicas

Cultivo de bacterias: Para el cultivo de secreciones se emplean medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre por técnica de estriado en cuadrantes, las condiciones de incubación en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas, también se emplea agar MacConkey con técnica de estriado en cuadrantes y condiciones de incubación a 37°C durante 24-48 horas. También se incluye la realización de tinción de Gram y tinción ZN.

Biopsias pulmonares o ganglios

Cultivo de bacterias: Para el procesamiento de este tipo de muestras primero se necesita macerar la biopsia con ayuda de un mortero con pistilo, ya que quede bien macerada se procede a sembrar en los medios de cultivo que son agar chocolate y agar sangre por técnica de estriado en cuadrantes, las condiciones de incubación en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas, también se emplea agar MacConkey con técnica de estriado en cuadrantes con condiciones de incubación a 37°C durante 24-48 horas y aquí se incluye otro medio que es el caldo Tioglicolato, aquí la muestra se inocula con ayuda de una pipeta desde el fondo del tubo hasta la superficie del caldo y se incuba a 37°C durante 24-48 horas. También se incluye la realización de tinción de Gram y tinción ZN.

Biopsias de otros sitios

Cultivo de bacterias: para el procesamiento de estas muestras el procedimiento es el mismo que para biopsias pulmonares. Sin embargo, aquí no se ocupa el caldo Tioglicolato porque solo es para biopsias provenientes de pulmón para detectar la presencia de patógenos aerobios.

Punta de catéter

Cultivo de bacterias: para el procesar las puntas de catéter solamente se siembra en agar sangre con Técnica de Maki, la cual es una técnica semicuantitativa que consiste en hacer rodar un segmento del catéter hacia delante y atrás 3 o 4 veces en la superficie una placa de agar sangre (Aldea et al., 2018). Posteriormente incubar la placa en atmosfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas.

Exudado faríngeo

Cultivo de bacterias: el exudado faríngeo se cultiva solo en casos de sospecha de *S. pyogenes*. El proceso de obtención de la muestra se realiza por personal del laboratorio, la muestra se debe obtener con ayuda de un hisopo especial frotando el área amigdalar y faringe posterior, así como cualquier zona inflamada o con úlceras, después se procede a inocular la muestra en agar sangre sobre el primer cuadrante de la placa, a continuación, en un área estéril se extiende la muestra con técnica de estriado en cuadrantes, por último, se incuba la placa en atmósfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas (Batista et al., 2006).

Exudado nasal

Cultivo de bacterias: para el cultivo de exudado nasal el proceso de obtención de la muestra se realiza por personal del laboratorio, la muestra se obtiene con ayuda de un hisopo especial impregnado de solución salina y se realiza frotando la fosa nasal derecha con movimientos rotatorios, después inocular la muestra en agar sangre y agar MacConkey en el primer cuadrante, se repite el mismo procedimiento para la fosa nasal izquierda (Bou et al., 2015), a continuación, en un área estéril se extiende la muestra con técnica de estriado en cuadrantes, por último, se incuba la placa de agar sangre en atmósfera a 5% de CO₂ a 36°C durante 24-48 horas y la placa de agar MacConkey se incuba a 37°C durante 24-48 horas.

Exudado nasofaríngeo

Solo se procesan exudados faríngeos provenientes del servicio de Urgencias o de Medicina del Trabajo. En el caso de los provenientes de otros servicios del hospital se aceptan las muestras y se envían al área de Virología y Biología Molecular.

Panel respiratorio: para procesar una muestra de exudado nasofaríngeo la muestra debe ser presentada en un tubo de Medio de Transporte Universal (UTM). La toma de muestra puede ser realizada por personal médico (en caso de pacientes hospitalizados) o por personal del laboratorio, en la obtención de la muestra se introduce un palillo de algodón estéril a través de la fosa nasal, hacia la nasofaringe rotando el palillo, después se deposita en el tubo UTM y se envía al laboratorio para su procesamiento. En el caso de muestras provenientes de Urgencias se utiliza un equipo llamado FilmArray que realiza una PCR multiplex anidada, que facilita la detección simultánea de múltiples patógenos como virus y bacterias en una sola muestra (BIOMÉRIEUX, 2025), para su procesamiento simplemente se carga un cartucho del equipo con la muestra, se introduce en el equipo y se espera aproximadamente 45 minutos a que estén los resultados. En el caso de muestras provenientes de Medicina del Trabajo se utiliza un Equipo llamado GeneXpert que realiza una PCR en tiempo real (qPCR), para su procesamiento solo se deposita una alícuota de la muestra en un cartucho para detectar SARS-CoV-2, Influenza A/B y Virus sincitial respiratorio (VSR), se introduce en el equipo y se espera aproximadamente 90 minutos para que estén los resultados.

Área de Bacteriología

El área de bacteriología es indispensable en el Laboratorio de Microbiología Clínica del INER debido a que cumple con funciones críticas para el diagnóstico, tratamiento y control de las enfermedades infecciosas. De los diversos papeles que cumple esta área en el laboratorio, está la identificación del agente etiológico de las infecciones; la realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana que permite determinar a qué antibióticos es resistente o sensible una bacteria y que así los médicos puedan prescribir el tratamiento más adecuado; también cumple con el control de infecciones nosocomiales, permitiendo la implementación de medidas de aislamiento y control, protegiendo a los pacientes y al personal de salud; y también participa en la vigilancia epidemiológica de patógenos prioritarios contribuyendo al reporte obligatorio de enfermedades infecciosas y a la prevención de epidemias.

Para poder llevar a cabo todas las actividades de rutina en un área tan importante, se necesita una muy buena organización. Dicho por el personal del laboratorio, la mayoría de las actividades realizadas son basadas en los Procedimientos en Microbiología Clínica de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

Identificación bacteriana

La primera actividad que se realiza es la lectura de los cultivos que están en proceso. Se organizan todos los cultivos por orden de folio de registro y primero se revisan los cultivos que tienen menos de 24 horas, aunque la mayoría aun no tienen el crecimiento suficiente, algunas pueden desarrollar crecimiento bastante rápido, si el crecimiento aun no es suficiente para identificar alguna bacteria se vuelve a incubar el cultivo hasta cumplir las 48 horas, si es que ya hay un crecimiento suficiente para poder identificar, se aplican técnicas de identificación fenotípica las cuales se basan en las características que pueden ser observables de las bacterias, como son la morfología de las colonias, la hemólisis o las propiedades bioquímicas y metabólicas. De igual manera se aplican estos criterios para los cultivos que cumplen las 48 horas de incubación. En algunos casos, aunque los cultivos presentan un crecimiento óptimo, el personal del laboratorio descarta la presencia de microorganismos patógenos; por lo tanto, estos cultivos se desechan. Lo mismo ocurre con aquellos que no muestran ningún tipo de crecimiento.

Identificación bacteriana por métodos fenotípicos

Las técnicas de identificación fenotípica bacteriana se basan en características observables que resultan de la expresión del genoma bacteriano, como la morfología celular, la apariencia de las colonias y las propiedades bioquímicas y metabólicas. Estas características se evalúan mediante cultivos y pruebas específicas en el laboratorio.

Dependiendo del tipo de muestra, pueden crecer distintas bacterias: algunas forman parte de la microbiota normal del cuerpo humano, mientras que otras pueden ser patógenas y responsables de la infección. Una tarea fundamental del personal de esta área es saber distinguir entre los distintos tipos de bacterias y aislarlas correctamente para su identificación. Para lograrlo, se aplican técnicas científicas combinadas con la experiencia empírica que permitan al observador tener una orientación inicial sobre el tipo de microorganismo que esté causando la infección.

Medios de cultivo: Uno de los métodos para la identificación de bacterias es el uso de medios de cultivo, ya que son fundamentales para el crecimiento y aislamiento de bacterias patógenas a partir de una muestra clínica. Los medios de cultivo ofrecen el ambiente y los elementos necesarios para ayudar al crecimiento de algunos microorganismos y, al mismo tiempo, inhibir el crecimiento de otros.

Entre los medios más utilizados en laboratorio destacan el agar Sangre, agar MacConkey y agar Chocolate.

El **agar Sangre** es un medio nutritivo, el cual permite el crecimiento de una amplia variedad de bacterias, tanto de microbiota como patógenas (también pueden crecer algunos tipos de hongos y levaduras). Una propiedad muy importante del agar sangre es que también actúa como medio diferencial porque permite la detección de hemólisis, es decir, la capacidad de una bacteria de romper glóbulos rojos. (Caycedo et al., 2021). Pueden presentarse tres tipos de hemólisis:

- **Hemólisis alfa (α):** destrucción parcial (halo verdoso). Ejemplo: *Streptococcus pneumoniae* (**figura 6**).
- **Hemólisis beta (β):** destrucción total (halo transparente). Ejemplo: *Staphylococcus aureus* (**figura 7**).
- **Hemólisis gamma (γ):** sin destrucción (no cambia el medio). Ejemplo: *Klebsiella pneumoniae* (**figura 8**).



Figura 6. Colonias de *Streptococcus pneumoniae* con hemólisis alfa en agar sangre.

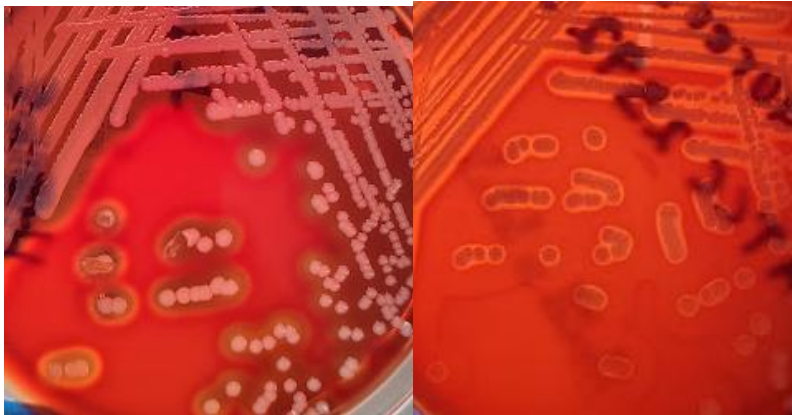


Figura 7. Colonias de *Staphylococcus aureus* presentando hemolisis beta en agar sangre.



Figura 8. Colonias de *Klebsiella pneumoniae* con hemolisis gamma en agar sangre

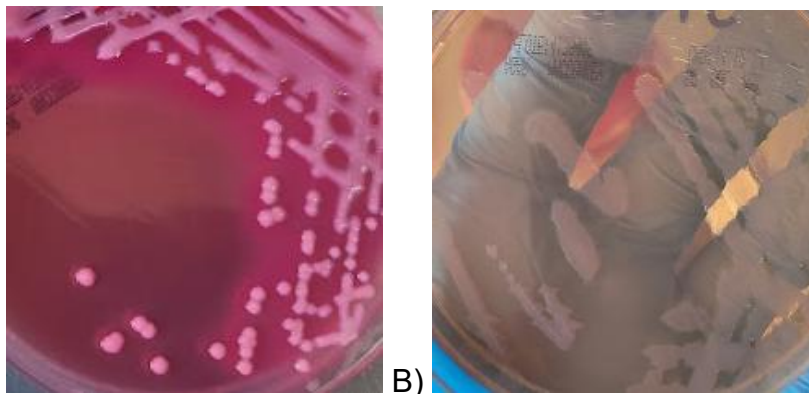


Figura 9. Colonias de bacterias Gram negativas en agar MacConkey. A) *Klebsiella pneumoniae* fermentadora de lactosa, B) *Pseudomonas aeruginosa* no fermentadora de lactosa

El tipo de medio en el que crece una bacteria puede ser una herramienta útil para orientar su identificación, especialmente en el caso de bacterias patógenas. Sin embargo, esta no es la única técnica rutinaria utilizada en el laboratorio con ese

propósito. En los medios de cultivo, las bacterias forman colonias con características morfológicas distintas que también contribuyen a su identificación.

Morfología colonial: la observación de la morfología de las colonias es un aspecto clave para realizar una identificación preliminar y distinguir entre diferentes microorganismos. En la **figura 10** se muestran algunas características para diferenciar las colonias como son: tamaño, forma, borde, transparencia, brillo, color, textura, elevación y consistencia (Nepita, 2020). Aunque no entra como una característica morfológica, el olor puede ser una característica adicional muy útil para orientar en la identificación bacteriana.

Algunas bacterias pueden formar colonias muy similares entre sí, lo que dificulta una identificación precisa solo con base en su crecimiento en algún medio de cultivo o su morfología colonial. En casos donde la identificación no es concluyente, se puede recurrir a una tinción de Gram, una técnica que permite observar la morfología celular individual con mayor detalle y, de este modo, aumentar la certeza en la identificación del microorganismo.

Tinción de Gram: es una técnica de coloración diferencial que permite clasificar las bacterias según las características de su pared celular. Su fundamento se basa en la distinta capacidad que tienen las bacterias para retener el colorante cristal violeta, dependiendo de la composición de su envoltura celular. Las bacterias Gram positivas presentan una pared celular gruesa de peptidoglicano, lo que les permite retener el cristal violeta incluso después del proceso de decoloración, por lo que se observan de color violeta al microscopio. En cambio, las bacterias Gram negativas tienen una pared más delgada y una membrana externa adicional, lo que hace que pierdan el colorante primario durante la decoloración y se tiñan de rosa con la safranina, el colorante de contraste (Bado, 2022). Esta técnica permite observar la morfología bacteriana, y constituye una herramienta clave para facilitar la identificación de bacterias patógenas (**figura 11**).

Después de realizar una identificación preliminar mediante las técnicas previamente mencionadas, es necesario aplicar métodos complementarios que permitan confirmar la identidad del microorganismo. Entre estos se encuentran las pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas: constituyen una herramienta fundamental ya que permiten detectar las actividades metabólicas y enzimáticas características de cada especie bacteriana. Estas pruebas se basan en la capacidad de las bacterias para fermentar azúcares, descomponer compuestos específicos o producir ciertas enzimas, lo que facilita una identificación más precisa del agente infeccioso.

Como rutina, en el área de bacteriología se acostumbran a realizar tres pruebas bioquímicas principales las cuales son: catalasa (para Gram positivas), oxidasa e indol rápido (para Gram negativas).

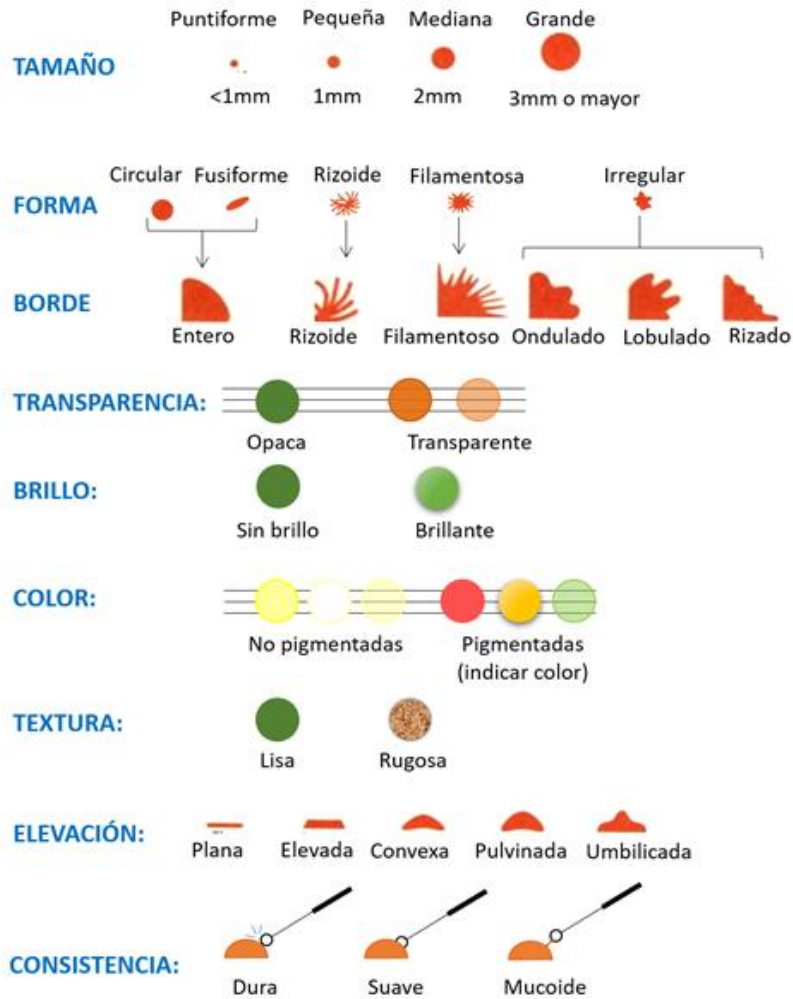


Figura 10. Morfología colonial



Figura 11. Tinción de Gram con aparentes bacilos cortos Gram positivos.

La prueba de **catalasa** es una técnica bioquímica sencilla utilizada para detectar la presencia de la enzima catalasa, la cual descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. Esta prueba es especialmente útil para diferenciar bacterias **Gram positivas**: los géneros *Staphylococcus spp.* son catalasa positivos,

mientras que *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* son catalasa negativos. El procedimiento consiste en colocar una gota de peróxido de hidrógeno sobre una lámina portaobjetos y añadir una pequeña cantidad de la colonia bacteriana. Si la muestra produce burbujas de inmediato, el resultado se considera positivo, ya que la formación de burbujas indica la liberación de oxígeno y, por lo tanto, la presencia de la enzima catalasa (Bou et al., 2011).

La prueba de **oxidasa** es una técnica bioquímica utilizada para detectar la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, que participa en la cadena de transporte de electrones durante la respiración aerobia. Es útil principalmente para diferenciar bacterias **Gram negativas**, ya que algunos géneros, como *Pseudomonas spp.* y *Neisseria spp.*, son oxidasa positivos, mientras que la mayoría de las enterobacterias, como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.*, son oxidasa negativas. El procedimiento consiste en aplicar un reactivo, como el tetrametil-p-fenilendiamina, sobre papel impregnado o directamente sobre una colonia bacteriana. Un resultado positivo se manifiesta por un cambio rápido de color a morado oscuro dentro de los primeros 10 a 30 segundos, lo cual indica la presencia de la enzima (Bou et al., 2011).

La prueba de **indol** se utiliza para determinar si una bacteria es capaz de descomponer el aminoácido triptófano mediante la acción de la enzima triptofanasa, produciendo indol como subproducto. Esta prueba es útil para diferenciar bacterias pertenecientes a la familia **Enterobacteriaceae**. Se realiza generalmente en un medio como triptona o SIM, al que se le añade el reactivo de Kovac después de la incubación. Un resultado positivo se observa cuando aparece una capa de color rosado o rojo en la superficie del medio, lo que indica la presencia de indol. Bacterias como *Escherichia coli* son indol positivas, mientras que *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* suelen ser negativas (Bou et al., 2011).

Identificación bacteriana por métodos automatizados

Una vez que se consiguió una identificación por métodos fenotípicos siempre se lleva a cabo una identificación por métodos automatizados para confirmar la identidad del microorganismo patógeno.

MALDI-TOF: en el laboratorio se utiliza un sistema de detección llamado MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight), el cual utiliza una técnica de espectrometría de masas utilizada principalmente para la identificación rápida y precisa de biomoléculas, como proteínas, péptidos y azúcares, así como de microorganismos, especialmente bacterias y hongos (Relloso et al., 2015). MALDI-TOF es una herramienta muy útil, debido a que realiza la detección de microorganismos en menos de 30 minutos y resulta altamente eficiente para la detección temprana de microorganismos patógenos.

En algunos casos en los que no se consigue o se dificulta la identificación por MALDI-TOF debido a las características físicas de las colonias bacterianas, se utiliza otro sistema de identificación llamado VITEK 2.

VITEK-2: es un sistema automatizado utilizado para la identificación rápida de bacterias, hongos y levaduras, así como para la evaluación de su susceptibilidad a antimicrobianos. Funciona mediante el análisis bioquímico de microorganismos en tarjetas desechables, interpretando los resultados a través de un software con una base de datos extensa. Su alta precisión, rapidez y automatización lo convierten en un recurso clave para el diagnóstico oportuno de infecciones y la selección adecuada de tratamientos antimicrobianos (BIOMÉRIEUX, 2025).

Una vez identificada y confirmada la bacteria patógena, el resultado se reporta para que los médicos puedan indicar el tratamiento más adecuado para el paciente.

Pruebas de sensibilidad a antibióticos

Además de la identificación bacteriana, el área de bacteriología apoya en la realización de pruebas de sensibilidad para poder determinar a qué antibióticos es sensible o resistente una bacteria aislada de un paciente. Su objetivo principal es guiar al médico en la elección del tratamiento más eficaz, evitando el uso de antibióticos inadecuados y contribuyendo al uso racional de estos fármacos. Además, estas pruebas ayudan a detectar mecanismos de resistencia bacteriana, a realizar seguimiento epidemiológico y a prevenir la propagación de infecciones resistentes dentro del hospital.

Las pruebas de sensibilidad se realizan de dos diferentes maneras, uno a través de un sistema automatizado y el otro por medio de métodos de difusión.

VITEK-2: como se mencionó anteriormente este equipo además de la identificación también funciona para la evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos. Esto lo realiza mediante tarjetas automatizadas que contienen antibióticos. Al inocular las bacterias, el sistema monitorea su crecimiento, indicando si son susceptibles o resistentes a cada antibiótico. Los resultados se analizan automáticamente, proporcionando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) (BIOMÉRIEUX, 2025).

En algunos casos, ya sea porque el sistema automatizado falló o que se necesiten sensibilidades de antibióticos que no incluye el sistema, se recurren a técnicas manuales que son los métodos de difusión en placa, se pueden utilizar discos o tiras de E-test, dependiendo el microorganismo o el antibiótico.

Prueba de difusión en disco: este método consiste en sembrar una placa de agar Müller-Hinton con la bacteria en estudio y colocar discos de papel impregnados con antibióticos sobre la superficie. Tras la incubación, se observan zonas de inhibición alrededor de los discos, cuyo diámetro se mide y se compara con estándares internacionales para determinar si la bacteria es sensible, intermedia o resistente (**figura 12**). Aunque es una técnica menos confiable que un método automatizado, es sencillo de realizar y resulta muy útil en los casos en los que un sistema automatizado tiene limitantes, además esta técnica puede utilizarse para detectar

ciertos mecanismos de resistencia bacteriana, como la producción de BLEE o carbapenemasas (Cantón et al., 2000).

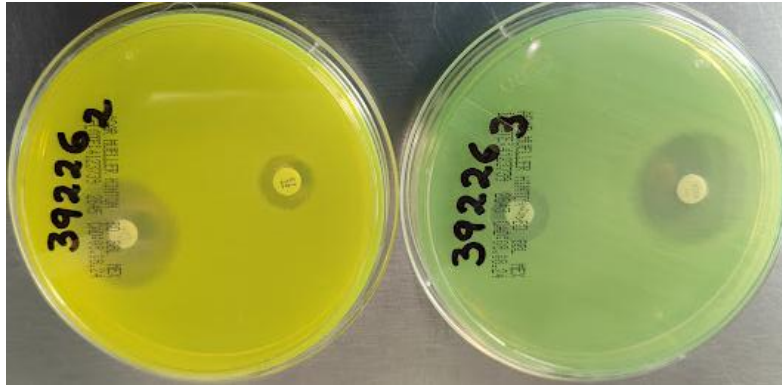


Figura 12: Prueba de sensibilidad de difusión en disco

Prueba de E-test: este método consiste en colocar una tira plástica con un gradiente de concentración del antibiótico sobre una placa de agar Müller-Hinton inoculada con la bacteria. Tras la incubación, se forma una elipse de inhibición alrededor de la tira, y el punto donde esta intersecta la escala del E-test indica la CMI (Cantón et al., 2000).

Algunos de los antibióticos que son utilizados para ver la sensibilidad de bacterias Gram positivas son: oxacilina, clindamicina, rifampicina, trimetoprima/sulfametoxazol, vancomicina, eritromicina, levofloxacino, moxifloxacino, linezolid, cefoxitina, nitrofurantoína, ampicilina, gentamicina, estreptomicina, ciprofloxacino, penicilina, ceftriaxona, claritromicina y amoxicilina/ácido clavulánico.

Y los que son utilizados para la sensibilidad de Gram negativas son: aztreonam, colistina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, amikacina, ciprofloxacino, tigeciclina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulánico, trimetoprima/sulfametoxazol, fosfomicina, claritromicina y ampicilina.

De igual manera, estos resultados se reportan para que los médicos puedan indicar un tratamiento más efectivo, evitar el uso de antibióticos innecesarios o ineficaces y reducir el riesgo de desarrollar resistencia antimicrobiana.

Área de Micología

En el ambiente hospitalario las enfermedades causadas por hongos y levaduras son de suma importancia, ya que muchas de estas infecciones pueden ser graves o incluso mortales, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. Es por esto, que el área de micología es fundamental para el diagnóstico y control de infecciones causadas por estos microorganismos. El área tiene la tarea de identificar oportunamente los hongos patógenos, así como evaluar su sensibilidad a medicamentos antifúngicos, lo cual es clave para otorgar un tratamiento adecuado. Además, contribuye al uso racional de antimicóticos, al seguimiento epidemiológico y al control de infecciones nosocomiales.

Siembra de muestras

En el área de siembras y recepción de muestras, se mencionó que los cultivos que van para bacteriología se procesan ahí mismo, en el área de micología se reciben las alícuotas de las muestras y se cultivan en medios de cultivo especiales. Todas las muestras se procesan siguiendo el mismo procedimiento y utilizando los mismos tipos de medios. En micología, los medios de cultivo utilizados de forma rutinaria son el agar Sabouraud y el agar Mycosel, los cuales se presentan en tubos y se siembran mediante la técnica de estriado en medio inclinado. Las condiciones de incubación corresponden a una atmósfera aerobia a 25 °C, durante un período de 7 a 30 días.

Identificación micológica

Los hongos y las levaduras son células eucariotas, por lo tanto, tienen un tamaño mayor que las bacterias y requieren más tiempo para alcanzar un crecimiento óptimo. Los cultivos se revisan cada 7 días durante 4 semanas, pasando este tiempo en difícil que se tenga un escaso desarrollo.

Identificación micológica por métodos fenotípicos

A diferencia de las bacterias, las colonias de hongos son mucho más fáciles de identificar, debido a que forman estructuras más grandes y complejas que pueden distinguirse a simple vista. Además, sus estructuras celulares presentan un tamaño mayor, lo que facilita su observación al microscopio. Para una identificación más precisa, los hongos se analizan tanto macroscópicamente como microscópicamente.

Observación macroscópica

En la observación macroscópica se evalúa el crecimiento del hongo en los medios de cultivo utilizados donde se pueden observar características como el color, forma, textura (algodonosa, pulverulenta o aterciopelada), tamaño y producción de pigmentos.

Medios de cultivo: dependiendo del crecimiento del hongo o levadura en el medio de cultivo, se puede descartar o considerar la posibilidad de que se trate de un microorganismo patógeno. Como se mencionó anteriormente, los medios utilizados para el cultivo son el agar Sabouraud y el agar Mycosel.

El **agar Sabouraud** es un medio de cultivo sólido diseñado para el aislamiento y crecimiento de hongos y levaduras. Su formulación incluye altas concentraciones de dextrosa, que proporciona una fuente rica de energía, y peptonas, que aportan nitrógeno y otros nutrientes esenciales. Además, su pH ligeramente ácido (aproximadamente 5.6) inhibe el crecimiento de muchas bacterias, favoreciendo el desarrollo selectivo de microorganismos fúngicos (Cuenca et al., 2006).

El **agar Mycosel** es un medio de cultivo selectivo y sólido diseñado para el aislamiento de hongos patógenos, especialmente a partir de muestras clínicas contaminadas con bacterias o hongos saprófitos. Contiene dextrosa como fuente de energía, peptona como fuente de nitrógeno y otros nutrientes, así como cloranfenicol y cicloheximida, que actúan como agentes inhibidores: el cloranfenicol suprime el crecimiento bacteriano y la cicloheximida inhibe hongos contaminantes no patógenos (Cuenca et al., 2006).



Figura 13. Crecimiento de hongo filamentoso en agar Sabouraud

Observación microscópica

En la observación microscópica se analiza la morfología de los hongos o levaduras, esto se realiza a través de tinciones que van a permitir observar las estructuras celulares que conforman estos microorganismos y de esta manera identificarlos fácilmente. En el área de micología se realizan algunas tinciones que se hacen directamente de la muestra, como son: Grocott, Wrigth, Kinyoun y Tinta China. Además, aunque no son clasificadas como tinciones los preparados en fresco como KOH y Azul de Lactofenol son muy útiles en la observación de las estructuras fúngicas.

Tinción de Grocott: su fundamento se basa en que los polisacáridos presentes en la pared celular fúngica oxidan a aldehídos mediante ácido crómico, los cuales luego reducen el nitrato de plata, tiñendo las estructuras fúngicas de color negro intenso. El fondo se contrasta con un tinte verde claro, permitiendo una diferenciación nítida entre los hongos y el tejido circundante. Esta tinción es altamente sensible y permite

detectar levaduras, hifas y esporas, incluso cuando están en baja cantidad (Wright & Mody, 2017) (**figura 14**).

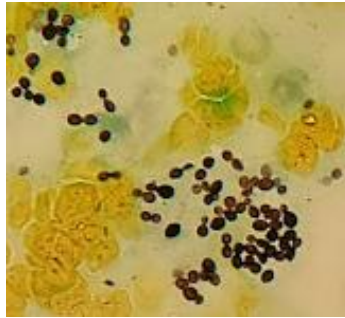


Figura 14. Levaduras en gemación en tinción de Grocott.

Tinción de Wright: aunque es una tinción hematológica, también puede utilizarse en micología. Su fundamento es que tiñe los componentes celulares mediante colorantes como eosina y azul de metileno, lo que permite observar detalles morfológicos. En micología, es útil para identificar levaduras intracelulares como *Histoplasma capsulatum* en muestras de sangre periférica o médula ósea, donde los hongos pueden aparecer como pequeños cuerpos azulados dentro de macrófagos (López et al., 2014) (**figura 15**).

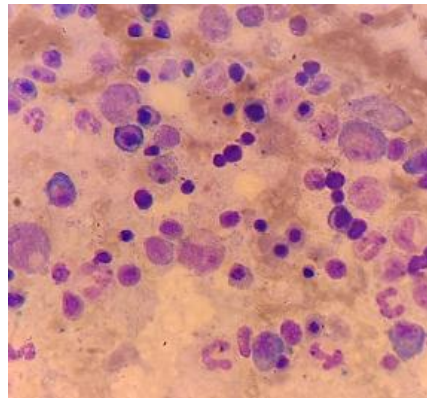


Figura 15. Levaduras intracelulares en tinción de Wright.

Tinción de Kinyoun: es una variante del Ziehl-Neelsen modificada sin calor y se basa en la resistencia de ciertas paredes celulares a la decoloración con ácido-alcohol. Utiliza fucsina como colorante primario, que tiñe de rojo a los organismos ácido-alcohol resistentes, mientras que el fondo se tiñe de azul con verde malaquita o azul de metileno. En micología, se usa ocasionalmente para detectar hongos como *Nocardia spp.* o algunos hongos dimorfos con paredes ricas en lípidos (Torres et al., 2019).

Tinción de Tinta China: es una técnica de contraste negativo que se emplea principalmente para detectar levaduras encapsuladas, como *Cryptococcus neoformans*, en líquido cefalorraquídeo. El fundamento consiste en que la tinta no

penetra la cápsula del hongo, lo que produce un halo claro alrededor de la levadura sobre un fondo oscuro (Cuenca et al., 2006).

Fresco con KOH: su fundamento radica en la capacidad del KOH (generalmente al 10–20%) para digerir y disolver las células epiteliales, la queratina y otros residuos celulares presentes en la muestra, aclarando el fondo sin afectar las estructuras fúngicas. Esto permite visualizar con mayor nitidez hifas, levaduras, conidios y esporas (Pérez et al., 2017).

Fresco con Azul de Lactofenol: se usa para observar hongos filamentosos cultivados. El ácido láctico fija las estructuras, el fenol evita contaminaciones y el azul de algodón tiñe las paredes celulares, facilitando la visualización de hifas, conidios y esporas. Esta técnica permite la identificación morfológica a nivel de género o especie (Cuenca et al., 2006) (**figura 16**).

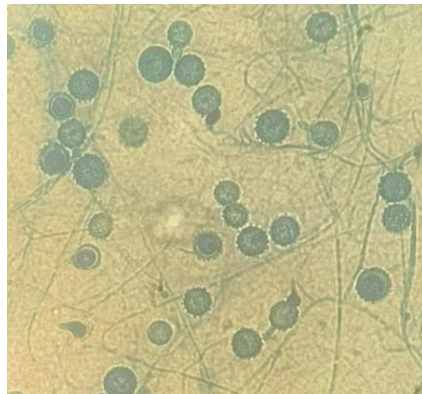


Figura 16. *Histoplasma capsulatum* en fresco de Azul de Lactofenol.

Identificación fúngica por métodos automatizados

Aunque la identificación fenotípica suele ser más sencilla y precisa en hongos que en bacterias, en algunos casos pueden surgir dudas sobre si se trata de un hongo o levadura patógeno. Por ello, también se recurre a métodos automatizados para su identificación. Al igual que en el área de bacteriología, en micología se emplean equipos como MALDI-TOF y VITEK 2 para apoyar la identificación de hongos y levaduras.

Identificación fúngica por métodos inmunológicos

En el área de micología además de la identificación por métodos fenotípicos y automatizados, también se emplean técnicas inmunológicas que se basan en la detección de antígenos del patógeno o de anticuerpos generados por el huésped en respuesta a la infección. Estas pruebas son especialmente útiles cuando el aislamiento del microorganismo es difícil o cuando se requiere un diagnóstico rápido. En esta área se utilizan los ensayos ELISA y la inmunofluorescencia.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay): se basan en la detección de antígenos o anticuerpos específicos en muestras biológicas como suero, plasma, orina o líquido cefalorraquídeo mediante la interacción altamente específica entre anticuerpos y antígenos, seguida de una reacción enzimática que produce un cambio de color, el cual puede medirse con un espectrofotómetro. Es útil para el diagnóstico de infecciones fúngicas sistémicas (León, 2019). Algunos ensayos ELISA que se realizan son: antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans*, antígeno de galactomanano de *Aspergillus spp.*, antígeno de *Histoplasma capsulatum* y anticuerpos anti *Coccidioides immitis*.

Inmunofluorescencia: es una técnica utilizada para la detección específica de *Pneumocystis jirovecii*, un hongo oportunista que causa neumonía en pacientes inmunocomprometidos, como aquellos con VIH/SIDA o bajo tratamiento inmunosupresor. Esta prueba utiliza anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo, los cuales se unen a antígenos presentes en la pared celular del hongo. Tras el procesamiento, las estructuras del hongo se visualizan mediante microscopía de fluorescencia como formas redondeadas fluorescentes (Rodiño et al., 2011).

Pruebas de sensibilidad a antifúngicos

Al igual que el área de bacteriología, aquí también se realizan pruebas de sensibilidad, para determinar a qué antifúngicos es sensible o resistente el hongo o levadura aislados en una muestra clínica. Esta información es clave para que el médico pueda seleccionar el tratamiento antifúngico más adecuado para el paciente, evitando el uso innecesario o incorrecto de estos medicamentos. De igual manera, estas pruebas permiten detectar posibles mecanismos de resistencia a los antifúngicos, facilitar el monitoreo epidemiológico y reducir el riesgo de diseminación de infecciones fúngicas resistentes dentro del hospital.

Las pruebas de sensibilidad se realizan a través de difusión en placa con tiras de E-test.

Prueba de E-test: a diferencia de la prueba realizada en bacteriología, aquí se usa agar papa dextrosa como medio de difusión y los antibióticos utilizados son: fluconazol, itraconazol, voriconazol, isavuconazol y anfotericina.

Área de Virología y Biología molecular

El área de Virología y Biología Molecular es una parte fundamental del laboratorio, ya que se encarga de la detección de virus que afectan principalmente al sistema respiratorio, como influenza, SARS-CoV-2, virus sincitial respiratorio (VSR), entre otros. A diferencia de otras secciones del laboratorio donde se cultivan bacterias u hongos, en esta área se utilizan técnicas moleculares que permiten identificar de forma rápida y precisa el material genético de los virus presentes en las muestras de los pacientes.

La importancia de esta área radica en que ayuda a confirmar o descartar infecciones virales en un corto tiempo, lo que permite al personal médico tomar decisiones oportunas sobre el tratamiento y las medidas de aislamiento o prevención necesarias dentro del hospital. Además, estos estudios son clave para el control de brotes y la vigilancia epidemiológica de enfermedades respiratorias. Gracias a esta área, el laboratorio contribuye de manera directa a mejorar la atención de los pacientes y a proteger la salud del personal y de la comunidad hospitalaria.

Identificación viral

A diferencia de las bacterias y hongos, los virus no pueden cultivarse fácilmente mediante métodos convencionales de laboratorio, por lo que para su detección e identificación se recurre a técnicas moleculares. La mayoría de las técnicas empleadas en esta área para la identificación de los virus respiratorios son de tipo molecular; por ello, gran parte de los procesos se realizan mediante sistemas automatizados especializados en estos métodos, como la extracción y purificación de material genético, así como la amplificación por PCR.

Extracción y purificación de material genético: la extracción consiste en romper las membranas de los virus para liberar su material genético (ADN o ARN). Este proceso puede realizarse mediante lisis química, utilizando detergentes o enzimas; lisis mecánica, mediante agitación; o una combinación de ambas. Una vez liberado el material genético, es necesario purificarlo para separarlo de otros componentes no deseados, como proteínas, lípidos, carbohidratos y restos celulares. Este paso garantiza que el material genético obtenido sea de alta calidad y pureza, requisito indispensable para su uso en técnicas posteriores, como la PCR (Ríos et al., 2016).

Dado que en el ámbito hospitalario se requiere rapidez en el diagnóstico de infecciones, se emplean sistemas automatizados para la extracción y purificación de ácidos nucleicos, los cuales utilizan tecnología basada en perlas magnéticas. Bajo condiciones específicas, el material genético se adhiere selectivamente a las perlas, mientras que las impurezas permanecen en solución y son eliminadas mediante sucesivos lavados. Finalmente, los ácidos nucleicos son liberados de las perlas en una solución limpia (elución), quedando listos para su utilización en técnicas moleculares posteriores. Este método, además de ser rápido, permite el

procesamiento simultáneo de múltiples muestras, optimizando así los procesos diagnósticos del laboratorio.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): esta técnica es utilizada para amplificar fragmentos específicos de material genético, permitiendo la detección de microorganismos incluso cuando se encuentran en cantidades muy bajas en la muestra.

En el caso de virus respiratorios, como influenza, SARS-CoV-2 o virus sincitial respiratorio (VSR), se utiliza una variante de esta técnica llamada RT-PCR (Reverse Transcription PCR), ya que estos virus contienen ARN como material genético. La RT-PCR comienza con la conversión del ARN viral en ADN complementario (cDNA) mediante la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente, este ADN es amplificado a través de ciclos térmicos que incluyen tres etapas principales:

1. **Desnaturalización**: Separación de las dos hebras de ADN mediante calor.
2. **Hibridación**: Unión de iniciadores específicos (primers) a las secuencias blanco.
3. **Extensión**: Síntesis de nuevas hebras de ADN mediante la acción de la ADN polimerasa.

En el laboratorio esta técnica es llevada a cabo mediante equipos automatizados como el GeneXpert, que realiza PCR en tiempo real (qPCR). Este sistema permite procesar las muestras de manera rápida y sencilla: se deposita una alícuota de la muestra en un cartucho específico para la detección simultánea de SARS-CoV-2, Influenza A/B y VSR, el cual se introduce en el equipo; tras aproximadamente 90 minutos, se obtienen resultados confiables y listos para interpretación.

La qPCR no sólo permite amplificar el material genético, sino también detectarlo y cuantificarlo de manera simultánea mediante el uso de sondas fluorescentes. Esta técnica es de gran importancia, ya que puede aplicarse tanto de forma cualitativa, para determinar la presencia o ausencia del virus, como de manera cuantitativa, para estimar la carga viral presente en la muestra (Méndez & Pérez, 2004)

Como el área no es específicamente para detectar virus, se pueden detectar mediante métodos moleculares otros tipos de microorganismos como bacterias y hongos. Algunos se identifican por medio de paneles del equipo FilmArray, por ejemplo, se realiza un panel respiratorio que detecta bacterias como: *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*; y virus como: Adenovirus, Coronavirus 229E, Coronavirus HKU1, Coronavirus NL63, Coronavirus OC43, SARS-CoV-2, Metapneumovirus humano, Rinovirus/Enterovirus humano, Influenza A, Influenza A/H1, Influenza A/H1-2009, Influenza A/H3, Influenza B, Virus parainfluenza 1, Virus parainfluenza 2, Virus parainfluenza 3, Virus parainfluenza 4 y Virus sincitial respiratorio. También por medio de un panel de Meningitis/Encefalitis, que detecta bacterias como: *Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pneumoniae*; levaduras como: *Cryptococcus neoformans/gattii*; y virus como: Cytomegalovirus, Enterovirus,

Virus herpes simple 1, Virus herpes simple 2, Herpesvirus humano 6, Parechovirus humano y Virus Varicella-Zóster.

Para la detección de algunos microorganismos se requieren procesos que no son completamente automatizados. Por ejemplo, en el caso de virus respiratorios como Influenza A, Influenza A/H1, Influenza A/H1-2009, Influenza A/H3, los linajes de Influenza B (Victoria y Yamagata), así como hongos como *Aspergillus spp.*, se realiza primero una extracción de ácidos nucleicos mediante sistemas automatizados basados en perlas magnéticas. Posteriormente, es necesario preparar manualmente una mezcla con todos los reactivos indispensables para llevar a cabo la PCR, entre los que se incluyen: el material genético extraído, la enzima polimerasa, primers específicos, dNTPs, iones de magnesio, agua libre de nucleasas y, en el caso de qPCR, sondas fluorescentes.

Finalmente, la mezcla se coloca en un termociclador, equipo que realiza de manera automática los ciclos de temperatura requeridos para que se lleve a cabo la reacción de amplificación por PCR.

Referencias

- Alados, J. C., Alcaraz, M. J., Aller, A. I., Miranda, C., Pérez, J. L., & Romero, P. A. (2010). Diseño de un laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(7), 453–460.
- Aldea Mansilla, C., Martínez-Alarcón, J., Gracia Ahufinger, I., & Guembe Ramírez, M. (2018). *Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares* (15.ª ed.). En E. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Álvarez Martínez, M., Buesa Gómez, J., Castillo García, J., & Vila Estapé, J. (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 30. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Bado, M. J. C. (2022). *La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana*. Revista del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica, 27(2), 89–98.
- Batista Díaz, N., Bordes Benítez, A., Díez Gil, O., Lecuona Fernández, M., & Lara Pérez, M. (2006). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 23. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Biblioteca Nacional de los Estados Unidos (NLM). (2023). *Cultivo de médula ósea*. MedlinePlus. Recuperado de <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/003682.htm>
- BIOMÉRIEUX. (2025). *Panel BIOFIRE Respiratorio 2.1*. BIOMÉRIEUX. Recuperado de <https://www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/clinical-products/biofire-respiratory-2-1-panels.html>
- BIOMÉRIEUX. (2025). *VITEK 2*. BIOMÉRIEUX. Recuperado de <https://www.biomerieux.com/us/en/our-offer/clinical-products/vitek-2.html>
- Bou Arévalo, G., Chaves Sánchez, F., & Oliver Palomo, A. (2016). Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(10), 667–675.
- Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J. A., Valdezate S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29 (8):601-608.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2005). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg* (F. Sánchez Frago, Trad.). El Manual Moderno.
- Cacho Calvo, J. B., Meseguer Peinado, M. A., Oliver Palomo, A., & Puig de la Bellacasa, J. (2007). Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 25. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Cantón Moreno, R., García Sánchez, J. E., Gómez-Lus, M. L., Martínez-Martínez, L., Rodríguez-Avial, C., Vila, J., & García Rodríguez, J. A.

(2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En J. J. Picazo (Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (1ª ed., cap. 11). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

- Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). *Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química*. NOVA publ. cient., 19(36), 49–94.
- Codina, M. G., de Cueto, M., Vicente, D., Echeverría, J. E., & Prats, G. (2011). *Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(2), 127–134.
- Cuenca Estrella, M., Gadea Gironés, I., Martín Mazuelos, E., Pemán García, J., Pontón, J., & Rodríguez Tudela, J. L. (2006). Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*, 21. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Friedman, C., & Newsom, W. (2011). *Conceptos básicos de control de infecciones de IFIC* (2.ª ed.). Federación Internacional del Control de las Infecciones.
- Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). (2017). Historia. Recuperado de <http://www.iner.salud.gob.mx/interna/historia.html>
- León, I. (2019, 17 de abril). ELISA. Recuperado de AllScience: <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3(1), 10–18.
- Méndez-Álvarez, S., & Pérez-Roth, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(3), 183–192.
- Nepita, A. L. (2020, 12 de octubre). Morfología colonial. Recuperado de ding! Microbiología: <https://dingmicrolab.wordpress.com/2020/10/12/morfologia-colonial/>
- Pérez Calonge, J. J., Casado Hernández, I., & Nuño, F. S. (2017). Técnica de examen directo de la onicomycosis mediante microscopía con hidróxido de potasio. *Revista Española de Podología*, 28(1), 46–52.
- Pérez-Padilla, J. R. (2010). Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas: 75 años de servicio. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*, 69(4), 191–194.
- Relloso, M. S., Nievas, J., Fares Taie, S., Farquharson, V., Mujica, M. T., Romano, V., Zarate, M. S., & Smayevsky, J. (2015). Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 103–107.
- Ríos Sánchez, E., Calleros, E., González Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., Hernández, S., & Pérez Morales, R. (2016). *Análisis*

comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. Acta Universitaria, 26(4), 56–65.

- Rodiño, J., Rincón, N., Aguilar, Y. A., Rueda, Z. V., Herrera, M., & Vélez, L. A. (2011). Diagnóstico microscópico de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en muestras de lavado broncoalveolar y lavado orofaríngeo de pacientes inmunocomprometidos con neumonía. *Biomédica, 31(2), 222–231.*
- Rodríguez Díaz, J. C., Guna Serrano, M. R., Larrosa Escartín, N., & Marín Arriaza, M. (2019). Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 37(5), 335–340.*
- Torres Murillo, B. J., Collazo López, E. M., Mosqueda Gómez, J. L., Álvarez Canales, J. A., & Aguirre Trigueros, J. (2019). Tinción de Kinyoun para el diagnóstico de *Cryptosporidium spp.* *Acta Médica Grupo Ángeles, 17(2), 179–180.*
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología* (9.^a ed., A. M. Morillo, Trad.). Editorial Médica Panamericana.
- Wright, A. M., & Mody, D. R. (2017). *Aberrant staining with Grocott's methenamine silver: Utility beyond fungal organisms. Journal of the American Society of Cytopathology, 6(6), 223–227.*