



Manual de Procedimientos para Bacteriología

Código
MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023
Versión 01

Caja Costarricense de Seguro Social
Gerencia Médica
Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud

2023

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 2 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Elaborado por:	Comisión de Especialistas en Microbiología, CCSS: • Dr. Adrián Fallas Mora. Bacteriología, Hospital Dr. Fernando Escalante Pradilla. • Dr. Cristian Pérez Corrales. Bacteriología, Hospital Dr. Carlos Luis Sáenz Herrera. • Dra. Cristina García Marín. Bacteriología, Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia. • Dr. Diego Elizondo Wallace. Bacteriología, Hospital Dr. Adolfo Carit Eva. • Dra. Elvira Segura Retana. Bacteriología, Hospital San Juan de Dios. • Dra. Evelyn González Villalobos. Bacteriología, Hospital San Rafael de Alajuela. • Dra. Heylin Estrada Murillo. Bacteriología, Hospital México. • Dra. Karla Moreno Monge. Molecular, Hospital Dr. Adolfo Carit Eva. • Dra. Romein Walters Mais. Bacteriología, Hospital Tony Facio.	Comisión de Especialistas en Microbiología, CCSS. Dirección Desarrollo Servicios de Salud, Area Regulación y Sistematización Diagnóstico y Tratamiento, Laboratorios Clínicos.
Revisión de pares expertos:	• Dra. Ana Gabriela Cruz Chavarría. Supervisión de Laboratorios, Red Integrada de Prestación de Servicios de Salud Huetar Norte. • Dr. Ariel Miranda Padilla. Bacteriología, Hospital México. • Dr. Christopher Mairena Acuña. Bacteriología, Hospital Dr. Carlos Luis Sáenz Herrera. • Dr. Daniel Cascante Serrano. Bacteriología, Hospital San Juan de Dios. • Dra. Angie Cervantes Rodríguez, asistente. Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos.	• Dr. Gian Carlo González Carballo, Bacteriología, Hospital Dr. Rafael Ángel Calderón Guardia. • Dr. Luis Solano Alpízar, Especialista Bacteriología, Tecnodiagnostica S.A. • Dra. Natasha Tames Robles. Centro Nacional de Referencia en Bacteriología, INCIENSA. • Dra. Tábata Elizondo Alvarez. Centro Nacional de Referencia en Bacteriología, INCIENSA.
Revisado por:	Dr. Mario Mora Ulloa	Área Regulación y Sistematización Diagnóstico y Tratamiento
Aprobado por:	Dr. Wilburg Díaz Cruz	Gerencia Médica
Fecha revisión y aprobación:	Octubre 2023	
Próxima revisión:	Octubre 2024	
Observaciones	• Esta versión sustituye a la instrucción de trabajo IT.GM.DDSS.ARSDT-CNL-05062018. <i>Aislamiento de Streptococo del Grupo B en Mujeres Gestantes.</i> • La reproducción gratuita de este material con fines educativos y sin fines de lucro es permitida, siempre y cuando se respete la propiedad intelectual del documento. • No se permitirá la reproducción comercial del producto sin la autorización de la CCSS y la Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud.	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 3 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Índice

Índice	3
Presentación	5
Introducción	6
Definiciones, abreviaturas y símbolos.....	8
REFERENCIAS NORMATIVAS.....	18
Alcance	19
Objetivo General	19
Metodología	19
Responsable del cumplimiento.....	20
Responsable de verificar el cumplimiento.....	20
Módulo 1: Diagnóstico microbiológico de infecciones del tracto urinario: Análisis de urocultivos	21
Módulo 2: Diagnóstico microbiológico de infecciones gastrointestinales: Análisis de Coprocultivos	30
Módulo 3: Detección microbiológica de Streptococcus agalactiae (SGB) mediante tamizaje de mujeres embarazadas.....	40
Módulo 4: Diagnóstico microbiológico de sepsis: Análisis de Hemocultivos.....	45
Módulo 5: Diagnóstico microbiológico de infecciones del sistema nervioso central: Análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR)	57
Módulo 6: Diagnóstico microbiológico de infecciones intraabdominales: Análisis de líquido peritoneal	67
Módulo 7: Diagnóstico microbiológico de infecciones tracto respiratorio inferior: Análisis de líquido pleural	76
Módulo 8: Diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas al parto: Análisis de líquido amniótico.....	84
Módulo 9. Diagnóstico microbiológico de infecciones pericárdicas: Análisis de líquido pericárdico	92
Módulo 10: Diagnóstico microbiológico de artritis: Análisis de líquido sinovial/articular	98
Módulo 11. Diagnóstico microbiológico de infecciones en piel y tejidos blandos: Análisis de hueso	108

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 4 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

<i>Módulo 12. Diagnóstico Microbiológico de infecciones de piel y tejidos blandos.....</i>	<i>116</i>
<i>Módulo 13 Diagnóstico Microbiológico de Infecciones Genitales.....</i>	<i>125</i>
<i>Módulo 14: Diagnóstico microbiológico de infecciones del sistema respiratorio.....</i>	<i>139</i>
<i>Módulo 15: Diagnóstico microbiológico de infecciones oculares.....</i>	<i>157</i>
<i>Módulo 16: Diagnóstico microbiológico de infección por Clostridioides difficile</i>	<i>167</i>
<i>Módulo 17. Tamizaje de microorganismos MultiDrogo-Resistentes (MDR)</i>	<i>180</i>
<i>Módulo 18. Diagnóstico microbiológico de infecciones por bacterias anaerobias.....</i>	<i>187</i>
<i>Módulo 19: Aseguramiento de la calidad en Bacteriología.....</i>	<i>197</i>
<i>14. Declaración de intereses.....</i>	<i>209</i>
<i>14. Contacto para consultas.....</i>	<i>209</i>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia División Médica Dirección de desarrollo de servicios de salud	Página 5 de 209
Manual de procedimientos de Bacteriología	Código: GM-DDSS-ARSDT-CNL-	Versión: 01

Presentación

La Caja costarricense de Seguro Social requiere herramientas que faciliten la prestación los servicios de salud en forma integral al individuo, la familia y la comunidad. Sobre esta base, el uso de la evidencia científica constituye un insumo fundamental que permite el desarrollo de una gran cantidad de aplicaciones requeridas para el buen definir de los servicios de salud.

La Ley de Control Interno establece la obligatoriedad de que los titulares subordinados tengan identificados, levantados y documentados sus procedimientos de trabajo, lo que resulta fundamental en el desarrollo de sistemas de información.

En este contexto, la Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos se planteó consolidar los procedimientos de Bacteriología de manera normalizada. Para alcanzar este objetivo se constituyó una comisión de especialistas que, mediante reuniones periódicas, se encargó de establecer las prioridades y reunir la evidencia más actualizada para el desarrollo de un manual de procedimientos, que sirva como insumo para que laboratorios clínicos institucionales cumplan con su responsabilidad diagnóstica de manera eficiente y normalizada.

Agradecemos a los profesionales involucrados en la concepción, diseño, redacción, revisión y análisis de este manual, con la firme convicción de que se realice el diagnóstico de las enfermedades infecciosas bacterianas con la mejor evidencia de laboratorio.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 6 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Introducción

Los laboratorios de bacteriología se han consolidado como actores fundamentales para el estudio de los microorganismos y su relación con salud humana, proporcionando información crítica sobre los agentes infecciosos que causan enfermedades.

La CCSS cuenta con una robusta red de laboratorios clínicos, donde se utilizan técnicas y herramientas especializadas para identificar los microorganismos que pueden estar presentes en diversidad de muestras biológicas, y a los que se puede atribuir un proceso infeccioso.

La identificación de un patógeno es clave para la medicina basada en evidencia y orienta además hacia el tratamiento antimicrobiano adecuado para los usuarios del sistema de salud.

El impacto de un diagnóstico certero, junto con un abordaje terapéutico apropiado, repercuten no sólo sobre la salud individual sino sobre toda la sociedad, promoviendo la salud colectiva, reduciendo la utilización reiterada de los servicios de salud y la optimización de los recursos institucionales.

Los laboratorios de bacteriología también juegan un papel importante en la vigilancia epidemiológica, ya que pueden identificar brotes de enfermedades infecciosas o fenómenos de resistencia a los antimicrobianos. Con su aporte, las autoridades locales y nacionales establecen medidas preventivas o correctivas, destinadas a controlar la propagación de los agentes que representen peligros para la salud pública.

Es por ello que; por primera vez, se ha confeccionado un manual de procedimientos de bacteriología para la red de laboratorios en la CCSS. Este manual ha sido elaborado a partir de la constitución de una comisión de microbiología, conformada por profesionales altamente capacitados en el área, con el objetivo de revisar la literatura, guías actuales en la materia y recopilar los conocimientos necesarios para normalizar los procedimientos en los laboratorios clínicos de la institución.

La importancia de contar con un manual de bacteriología radica en la necesidad de garantizar la calidad y la confiabilidad de los resultados de los análisis microbiológicos que se realizan en los laboratorios de la CCSS. Este manual establece las bases para la correcta identificación y aislamiento de los microorganismos que causan infecciones, favoreciendo así un diagnóstico preciso y un tratamiento efectivo.

El presente manual consta de 19 módulos, cubriendo los tipos de análisis más comunes que se solicitan en las diferentes estancias prestatarias de salud: áreas de salud y hospitales periféricos, regionales, nacionales y especializados.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 7 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

El manual de bacteriología describe los procedimientos para el transporte, el procesamiento y la interpretación de los resultados de los análisis microbiológicos. También especifica los medios de cultivo y el equipo necesario para llevar a cabo los diferentes procedimientos, así como los elementos de gestión de la calidad recomendados para implementar en la rutina del laboratorio.

Este manual representa el consenso de los especialistas de la comisión institucional de bacteriología, posterior a la discusión de cada uno de los temas y tomando en consideración la racionalidad, evidencia, idoneidad y aplicabilidad de los procesos. Los temas no necesariamente representan decisiones unánimes, pero son el resultado de la discusión, aclaración de las objeciones más relevantes y votación positiva por la mayoría. Cuenta con el aval de las entidades competentes y además, fue validado por diferentes miembros de la comunidad de especialistas en bacteriología con que cuenta la red de laboratorios clínicos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 8 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Definiciones, abreviaturas y símbolos

Absceso: acumulación de pus en espacios tisulares confinados en cualquier parte del cuerpo.

Adenoiditis: inflamación de los adenoides.

Agar cromogénico/medio cromogénico: es un medio de cultivo sólido diferencial que contienen sustratos cromogénicos (un compuesto o sustancia que contiene un grupo formador de color), que permiten la diferenciación o selección de muchos microorganismos de importancia clínica e industrial, dando como resultado producción de color. Estos colores serán característicos dependiendo del microorganismo objetivo y permitirán una diferenciación fácil y precisa.

Angina de Ludwig: infección que compromete el piso de la boca, debajo de la lengua, y se presenta después de una infección de las raíces de los dientes o una lesión en la boca.

Angina de Vincent: amigdalitis aguda, generalmente unilateral, caracterizada por una ulceración profunda, y ocasionada por una simbiosis entre fusobacterias y espiroquetas.

Antibiograma: estudio que mide la sensibilidad de una bacteria frente a diferentes antimicrobianos in vitro y a partir de estos resultados predice la eficacia in vivo. Con un antibiograma se pueden obtener resultados cualitativos que indican si la bacteria es sensible o resistente a un antibiótico, o cuantitativos que determinan la concentración mínima (CMI) de antimicrobiano que inhibe el crecimiento bacteriano (en µg/ mL o en mg/L). La interpretación de los resultados del antibiograma (sensible, intermedio o resistente) se realiza en función de los valores establecidos por diferentes comités, como CLSI y EUCAST.

Antimicrobiano: agente químico de origen natural o sintético que elimina microorganismos o detiene el crecimiento microbiano. Se agrupan de acuerdo con los microorganismos que actúan en forma primaria. Los antibióticos actúan contra bacterias, los antifúngicos contra hongos, antiparasitarios contra los parásitos, entre otros.

AMIES: es una modificación del medio de Cary Blair, que a su vez lo es del de Stuart. Básicamente, cambia el glicerofosfato por un fosfato inorgánico y el azul de metileno por carbón vegetal neutro farmacéutico. Además, añade iones Calcio y Magnesio, que ayudan a conservar la permeabilidad de la célula bacteriana.

Asa bacteriológica: instrumento de laboratorio tipo pinza que consta de una base que puede ser de nicromo, tungsteno platino que termina en aro o en punta. Se emplea para transportar, o arrastrar, o travesar inóculos (pequeño volumen que contiene

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 9 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

microorganismo en suspensión) desde la solución de trabajo al medio de cultivo (sólido o líquido) o de un medio a otro (resiembra). También sirve para la realización de frotis.

Bacterias anaerobias: bacterias que son capaces de sobrevivir y multiplicarse en ambientes que no tienen oxígeno.

Bacteriuria asintomática: presencia de bacterias en orina sin síntomas clínicos asociados a infección de tracto urinario. Su tratamiento se limita a gestantes y pacientes sometidos a cirugía urológica; por tanto, la detección de bacteriuria asintomática es requerida en estos contextos.

Balanopostitis: inflamación en el glande y en la piel del prepucio.

Bartolinitis: inflamación de la(s) glándula(s) de Bartolino, las cuales tienen la función de segregar fluido para lubricar la vagina. Si llegan a inflamarse, puede ocasionarse una obstrucción y formar un absceso.

Beta-hemólisis: halo claro alrededor de las colonias bacterianas, producto de una hemólisis total de los eritrocitos presentes en el agar sangre. Este fenómeno se puede visualizar en aislamientos de bacterias como *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*

Botulismo: enfermedad bacteriana causada por *Clostridium botulinum* productor de toxina, que afecta los nervios del cuerpo. Puede causar dificultad para respirar, parálisis muscular y muerte, y está asociado a intoxicación alimentaria.

Caldo Todd Hewitt: medio de cultivo líquido de enriquecimiento selectivo que favorece el crecimiento de estreptococos del grupo B a partir de muestras clínicas.

Capnofilia: atmósfera enriquecida en CO₂ (5-10%) que favorece el crecimiento de algunos microorganismos fastidiosos como *Streptococcus pneumoniae*.

Catalasa: prueba utilizada para comprobar la presencia de la enzima catalasa presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen la citocromo oxidasa. Se basa en la demostración de efervescencia rápida al verter 1 gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre una colonia aislada del microorganismo, producto de la acción de la catalasa que convierte el compuesto de agua y oxígeno.

Celulitis: infección de la piel que afecta la capa intermedia (dermis) y el tejido subcutáneo, y se manifiesta por enrojecimiento, inflamación y dolor en el área.

Células guía o “clue”: células del epitelio vaginal que aparecen recubiertas de bacterias y son sugestivas de un cuadro de vaginosis bacteriana.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 10 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Cervicitis: inflamación infecciosa o no infecciosa del cérvix. Los hallazgos pueden incluir flujo vaginal aumentado, sangrado vaginal, eritema y friabilidad cervical.

Chancro blando: infección de transmisión sexual causada por la bacteria *Haemophilus ducreyi*. Se manifiesta frecuentemente a modo de úlcera genital simulando un chancro de carácter sífilítico.

Cirugía LASIK: es la cirugía refractiva con láser más conocida y la que realiza con mayor frecuencia para corregir problemas de la visión.

Cistitis: inflamación infecciosa aguda o crónica que afecta a la vejiga urinaria. La cistitis aguda no complicada es la manifestación más frecuente de la infección del tracto urinario inferior, afecta sobre todo a mujeres jóvenes sexualmente activas y se caracteriza por la aparición de típica sintomatología irritativa: disuria, urgencia, tenesmo vesical y polaquiuria (síndrome miccional). Se suele acompañar de hematuria, ocasionalmente de dolor suprapúbico y más infrecuentemente de febrícula.

Corioamnionitis: proceso inflamatorio/infeccioso del contenido uterino (líquido amniótico, placenta, membranas fetales).

Criterio de Nugent: se basa en una puntuación que se le aplica a la observación microscópica del flujo vaginal. Si esta se encuentra entre 0 y 3, se considera como microbiota vaginal normal, pero si se encuentra entre 7 y 10, es altamente sugestiva de una vaginosis bacteriana.

CT: el umbral del ciclo -Cycle threshold- (CT) hace referencia al número de ciclos en un ensayo de PCR de tiempo real, necesario para amplificar el ADN para alcanzar un nivel detectable. El valor de CT puede indicar el nivel relativo de material genético en una muestra (cuanto más bajos sean los valores del CT reflejarían niveles más altos de material genético).

Culdocentesis: procedimiento que se emplea para verificar la existencia de líquido anormal en el espacio detrás de la vagina, denominado fondo de saco.

Dermatitis: inflamación de las capas superficiales de la piel.

Dispersión/agotamiento: método de inoculación de muestras que consiste en separar en zonas para obtención de colonias aisladas de morfotipos bacterianos.

DIU: dispositivo pequeño colocado en el útero para prevenir embarazos.

Diverticulitis: inflamación de los divertículos del colon.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 11 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Ectima: infección que se caracteriza por úlceras pequeñas y superficiales que se extienden a capas profundas de la piel, con ocasional producción de pus.

Endometritis: inflamación del endometrio, la mucosa y epitelio que recubren el interior del útero.

Enfermedad inflamatoria pélvica: síndrome agudo debido al ascenso de microorganismos de la vagina o el cuello uterino al endometrio, trompas uterinas y, en ocasiones, a las estructuras vecinas (ovarios, peritoneo y cavidad pelviana).

Epidemiología local (microbiológica): análisis multifactorial de los agentes etiológicos aislados con su respectiva tendencia de sensibilidad a los antimicrobianos, específico para cada centro de salud.

Epididimitis: hinchazón (inflamación) del epidídimo, el conducto que conecta el testículo con los vasos deferentes. Puede ser secundaria a ITU o a uretritis por agentes de transmisión sexual.

Erisipela: infección de la piel que afecta la capa superior y los ganglios linfáticos locales, caracterizada por una placa eritematosa de extensión variable, de bordes bien definidos y que puede causar dolor y prurito.

Eritrodermia exfoliativa: reacción cutánea caracterizada por enrojecimiento del 90% o más de la piel, asociado a malestar general y linfadenopatías.

Espiroquetas: bacterias con morfología espiral que varía desde aquellas con giros poco evidentes a formas rígidas con aspecto de sacacorchos.

Evidencia de crecimiento en medio líquido: se refiere a la observación de turbidez, película, estrías, grumos, mal olor, producción de gas. Estos hallazgos se evidencian en el medio líquido tras su incubación.

Fascitis: inflamación de la fascia, que corresponde al tejido que está debajo de la piel y recubre los músculos, y cuya infección puede llevar al necrosamiento de los tejidos circundantes.

Foliculitis: inflamación de folículos pilosos.

Forunculosis: infección del folículo pilosebáceo que se engloba dentro de las piodermitis.

Gastroenteritis: inflamación del revestimiento del estómago y los intestinos.

Gangrena gaseosa: forma de necrosis potencialmente mortal, que afecta músculo, progresa rápidamente y se caracteriza por producción de gas en los tejidos afectados.



Gingivitis: inflamación de las encías.

Glándulas de Bartholin: glándulas secretoras que se ubican a los lados de la abertura vaginal y segregan el fluido que ayuda a lubricar la vagina.

Glándulas de Skene: glándulas periuretrales o parauretrales encargadas de la lubricación de la uretra distal.

Granuloma inguinal: infección rara y progresiva de la piel genital y perineal causada por *Klebsiella granulomatis*. Se caracteriza por lesiones lentamente progresivas, rojo carnosas, sobreelevadas, indoloras y, a menudo, ulceradas.

Herida quirúrgica: corte o incisión en la piel que normalmente está hecha con un bisturí durante la cirugía.

Homogeneizador automatizado de muestras: instrumento de homogeneización en el que la muestra se mezcla dentro de una bolsa especial desechable, cuya fuerza de acción se basa en el movimiento de dos paletas mecánicas recíprocas.

Inmunocromatografía: técnica de diagnóstico inmunológico que se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra se coloca en la zona de conjugado, el cual está formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítomos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra posee el antígeno a analizar la acumulación de complejos inmunes se evidencia en zonas específicas que posee anticuerpos de captura previamente fijados.

Impétigo: infección superficial de la piel que se presenta como placas eritematosas, y puede provocar la aparición de úlceras costrosas, amarillentas y en ocasiones pequeñas ampollas.

Islas/locus de patogenicidad: las islas patogénicas (PAIs) son segmentos de ADN bacteriano que portan uno o más genes de virulencia, los cuales han sido adquiridos en bloque de una fuente externa.

Lesión herpética: lesión a nivel de piel y/o mucosas, manifestada como ampollas, principalmente en boca, genitales y alrededores, y ocasionado por los Virus Herpes Simplex I y II.

Linfadenitis: inflamación de ganglios linfáticos.

Linfangitis: inflamación de vasos linfáticos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 13 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Linfogranuloma venéreo: enfermedad de transmisión sexual que compromete los ganglios linfáticos del área genital y es causada por *Chlamydia trachomatis*.

Macerador de tejidos: dispositivo descartable empleado para la tritución de muestras de tamaño pequeño.

Mastoiditis: inflamación de la apófisis o hueso mastoideo.

Material de osteosíntesis: dispositivos mecánicos de metal que se emplean en intervenciones ortopédicas de diversa índole para la fijación de fracturas óseas.

Mechero Bunsen: es un instrumento utilizado en laboratorios para calentar muestras y sustancias químicas

Mediastinitis: inflamación del mediastino.

Medio de transporte: es un medio de cultivo que es capaz de mantener la viabilidad de una muestra o una cepa, permitiendo que los microorganismos se mantengan viables en un período prolongado y sobre todo sin alterar su concentración.

Meningitis: es la inflamación de las leptomeninges (las membranas que rodean el cerebro y la médula espinal).

Microaerofilia: hace referencia a las condiciones de baja y estricta concentración de oxígeno (5-10%) que requieren determinados organismos para su desarrollo. Entre ellos cabe destacar la importancia de *Campylobacter* y *Helicobacter*.

Microbiota: conjunto de microorganismos que habitan la piel y superficies mucosas.

Microbiota normal: conocida también como flora normal o flora nativa. Es el conjunto de microorganismos que se localizan de manera habitual en distintos sitios del cuerpo humano.

Nasofaringitis: inflamación en la faringe y cavidades nasales.

Neumonitis: inflamación del tejido pulmonar.

Orquitis: inflamación de uno o ambos testículos.

Osteomielitis: infección tanto de médula como de corteza ósea, que puede llegar a afectar al periostio y a los tejidos blandos que rodean el hueso.

Oxidasa: esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 14 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

de hidrógeno según la especie bacteriana. Es empleada en la clasificación de la gran mayoría de grupos bacterianos.

Paroniquia: infección de los tejidos periungueales.

Periodontitis: fase avanzada de la enfermedad gingival que afecta a los tejidos blandos, ligamentos y huesos circundantes.

Pie diabético: infección, ulceración o destrucción de los tejidos profundos del pie, asociados a neuropatía y/o enfermedad vascular periférica de diferente magnitud, en las extremidades inferiores de los pacientes con Diabetes Mellitus.

Pielonefritis: infección del riñón (urinaria alta) que provoca la inflamación aguda o crónica de la pelvis renal y el tejido de los riñones. La causa más común es una infección urinaria baja que asciende a tejido renal. La sintomatología se desarrolla entre unas pocas horas o días e incluye fiebre elevada, escalofríos, dolor lumbar y ocasionalmente náuseas y vómitos. Puede evolucionar rápidamente a sepsis.

Proctitis: inflamación del revestimiento interno de la pared del recto (mucosa rectal).

Profilaxis intraparto: tratamiento indicado a mujeres gestantes previo a labor de parto para erradicar colonización/infección bacteriana, por ejemplo, el uso de ampicilina contra estreptococos del grupo B.

Prostatitis: inflamación de la próstata. Comprende un conjunto de síndromes, enfermedades y trastornos funcionales que afectan a la próstata o al área perineal, generando síntomas urinarios con presentación aguda o crónica.

Prueba CAMP: técnica que involucra la interacción de una proteína extracelular bacteriana que provoca una hemólisis completa en forma de flecha de los eritrocitos en placas de agar sangre cuando actúa sinérgicamente con la beta-hemolisina producida por *Staphylococcus aureus*. Se usa para la identificación presuntiva de *S. agalactiae*.

Punción suprapúbica: introducción de una aguja estéril en la vejiga urinaria a través de la pared abdominal, con el objeto de obtener una muestra de orina mediante la aspiración con jeringa, para su análisis.

Salpingitis: inflamación de las trompas de Falopio.

Sedimento: es la materia que, después de haber estado en suspensión en un líquido, termina en el fondo por su mayor gravedad, se puede obtener luego de procesos como la centrifugación.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 15 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Sepsis neonatal temprana: cuadro clínico séptico en el recién nacido que ocurre durante la primera semana de vida.

Sepsis neonatal tardía: cuadro clínico séptico en el recién nacido que ocurre después de la primera semana de vida y hasta el mes cumplido de nacimiento.

Sífilis: enfermedad de transmisión sexual causada por la bacteria *Treponema pallidum*. Se desarrolla en tres etapas: la primera, con una úlcera indolora que aparece en el punto de entrada de la infección; la segunda, con erupciones cutáneas, fiebre, fatiga, cefalea e inapetencia; y la tercera, con daños en aorta, cerebro, médula espinal y otros órganos.

Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis: consiste en equipos, instrumentos y/o accesorios utilizados para crear un ambiente sin oxígeno para el cultivo de anaerobios estrictos o facultativos. Abarca desde una cámara de anaerobiosis hasta el empleo de accesorios como jarras o bolsas con cierre hermético, son métodos que permiten que el oxígeno atmosférico sea consumido reemplazándolo por una mezcla gaseosa libre de oxígeno. En este tipo de sistemas se deben utilizar mecanismos de control (indicadores de oxidorreducción) para comprobar visualmente que las condiciones anaeróbicas fueron alcanzadas y mantenidas.

Sistema generador de atmósfera de capnofilia: consiste en equipos, instrumentos y/o accesorios utilizados para crear un ambiente con una concentración entre el 5 y el 10% de dióxido de carbono (CO₂). Abarca desde una incubadora que con un dispositivo de monitorización del CO₂, extrae el aire de la incubadora en una cámara de muestra, determina la concentración de CO₂, e inyecta CO₂ puro en la incubadora hasta alcanzar la concentración adecuada, también existen jarras con cierre hermético con sobres catalizadores que generen esta atmósfera, o hasta el uso de jarras con candela, la llama de la candela se quema hasta extinguirse por falta de oxígeno, lo que crea una atmósfera pobre en oxígeno y rica en dióxido de carbono en el frasco, este último método debe ser utilizado como última opción, ya que no cuenta con mecanismos de control que comprueben que se llegó a la concentración adecuada de CO₂.

Sistema generador de atmósfera de microaerofilia: consiste en equipos, instrumentos y/o accesorios utilizados para crear un ambiente con poco oxígeno, alrededor de un 5% y una concentración alta de dióxido de carbono, entre 5% y el 10%, para el cultivo de bacterias que requieren de bajas concentraciones de oxígeno para su desarrollo. Abarca desde cabinas de microaerófilos que combinan hasta cuatro gases (nitrógeno, dióxido de carbono, aire y una mezcla de 10% de hidrógeno / 90% de nitrógeno) en proporciones seguras y variables para proporcionar esa atmósfera específica, hasta el empleo de accesorios como jarras o bolsas con cierre hermético con sobres catalizadores que generan esas concentraciones definidas de oxígeno y dióxido de carbono.

Sistema MALDI-TOF: es un sistema de identificación microbiana basado en la espectrometría de masas MALDI-TOF, que permite la identificación de microorganismos en

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 16 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

pocos minutos hasta el nivel de especie. Este sistema determina la huella proteómica única de un microorganismo y combina patrones característicos con una extensa biblioteca de referencia para determinar la identidad del organismo. La expansión continua de la biblioteca de referencia garantiza que se pueda identificar fácilmente una amplia gama de microorganismos.

Skenitis: inflamación de las glándulas de Skene (periuretrales o parauretrales), que se localizan a los lados de la uretra distal.

Sobrenadante: líquido que queda sobre un sedimento o precipitado, después de producido un proceso de sedimentación, como lo es la centrifugación.

Sonda Foley: tipo común de sonda permanente. Es una sonda suave de plástico o caucho que se introduce en la vejiga para vaciarla de orina.

Sonicador de baño de baja frecuencia: equipo cuya corriente eléctrica transmite su energía a un sistema mecánico que la convierte en vibraciones de alta intensidad, generando ondas de ultrasonido, las cuales producen, a su vez, vibraciones en muestras biológicas para su procesamiento.

String test: método empleado para diferenciar bacterias Gram positivas de Gram negativas, con base en las diferencias de su pared celular.

Tétanos: enfermedad bacteriana por *Clostridium tetani* productor de toxina que afecta los músculos y los nervios. Se caracteriza por una rigidez muscular que suele afectar la mandíbula y el cuello y que luego progresa hasta alcanzar otras partes del cuerpo.

Tonsilitis: inflamación de las amígdalas o tonsilas.

Toxina bacteriana: sustancias tóxicas formadas o elaboradas por las bacterias; usualmente son proteínas con elevado peso molecular y antigenicidad, algunas se utilizan como antibióticos y algunas en las pruebas cutáneas para demostrar la presencia o la susceptibilidad a ciertas enfermedades.

TSI: agar triple azúcar hierro. Prueba microbiológica utilizada para probar la capacidad de un microorganismo para fermentar azúcares y producir sulfuro de hidrógeno. A menudo se utiliza para diferenciar bacterias entéricas, incluidas *Salmonella* y *Shigella*.

Uretritis: inflamación de la uretra, conducto que transporta la orina desde la vejiga hacia el exterior del cuerpo.

Vaginitis: inflamación de la vagina que puede dar como resultado secreción, picazón y dolor.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 17 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Vulvovaginitis: inflamación de la región genital femenina externa, vulva y vagina.

Abreviaturas:

AGB: Agar cromogénico para estreptococo del grupo B.

CLIA: Inmunoensayo de quimioluminiscencia.

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute.

COLOVE: Comisión Local de Vigilancia Epidemiológica.

DFA: Ensayo de fluorescencia directa.

ELISA: Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.

ETS: Enfermedad de transmisión sexual.

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

FTA-ABS: Técnica de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescente.

HSV: Virus Herpes Simplex.

ID y PSA: Identificación y prueba de susceptibilidad a antimicrobianos.

IIA: Infecciones intraabdominales.

ITS: Infección de transmisión sexual.

ITU: Infección del tracto urinario.

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

LGV: Linfogranuloma venéreo.

MIF: Microinmunofluorescencia.

NAAT: Prueba de amplificación de ácido nucleico.

CPO: Microorganismo productor de carbapenemasas.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PMN: Polimorfonucleares.

SGB: Estreptococo del grupo B.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 18 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

SOSA: Especies de *Staphylococcus* distintos a *Staphylococcus aureus*.

TH: Caldo de enriquecimiento selectivo Todd Hewitt.

VDRL: Prueba de laboratorio de investigación de enfermedades venéreas. No treponémica para diagnóstico de sífilis.

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

REFERENCIAS NORMATIVAS

Cuadro I. Referencia normativa

Número	Nombre de normativas
Ley N° 5395. 30 de octubre de 1973	Ley General de Salud
Ley N° 5462. 24 de Diciembre de 1973	Reglamento Estatuto Servicios de Microbiología y Química Clínica
Ley N° 8239. Marzo 2002	Derechos y Deberes de las personas usuarias de los servicios de salud públicos y privados
Ley N° 7600. La Gaceta N° 112 del 29 mayo 1996.	Igualdad de oportunidades para las personas con discapacidad
Ley 8279. La Gaceta, N° 96, Mayo 2002.	Sistema Nacional para la Calidad
Ley N° 8292. Gaceta 169 del 04 Setiembre del 2002.	Ley General de Control Interno
Norma ISO 15189: 2007.	Laboratorios Clínicos: Requisitos particulares relativos a la calidad y la competencia
Artículo 2 sesión #8139 Junta Directiva CCSS, celebrada el 22 de marzo del 2007	Política de Calidad y Seguridad al Paciente de la CCSS

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 19 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

CCSS, 2006	Manual de Normas y Procedimientos Técnico-Administrativos de los Laboratorios.
CCSS, 2013	Manual de Bioseguridad Laboratorios Clínicos
CCSS, 2012	Manual de Apoyo para la Implementación de la Gestión de Calidad en los Laboratorios Clínicos
Decreto 41385-S Declaratoria Nacional del Plan de Acción de Antimicrobianos	Plan De Acción Nacional De Lucha Contra La Resistencia A Los Antimicrobianos Costa Rica 2018-2025
CCSS, 2002	Normas Institucionales Para La Prevención Y Control De Infecciones Intrahospitalarias
Manual IAAS - OPS, 2017	Prevención Y Control De Infecciones Asociadas A La Atención De La Salud
Manual de puestos CCSS, DAGP	Manual Descriptivo de Puestos, Febrero 2020

Alcance

El presente manual de procedimientos estandariza los procesos operativos, técnicos y criterios profesionales para la generación de reportes microbiológicos a partir de muestras clínicas en los Laboratorios Clínicos de la Caja Costarricense de Seguro Social.

Objetivo General

Proporcionar la guía de trabajo para las Divisiones y Secciones de Bacteriología que busca garantizar su calidad y unificar criterios relacionados con las fases preanalítica, analítica y postanalítica en la ejecución de pruebas de diagnóstico, monitoreo y control de enfermedades infecciosas bacterianas que se realizan en los Laboratorios Clínicos.

Metodología

Para el desarrollo del presente manual se definió y consolidó una sub-comisión de especialistas en Microbiología y Bacteriología en representación de hospitales especializados, nacionales y regionales.

La Comisión realizó un proceso de selección y priorización de tópicos para su revisión e inclusión en el Manual de Procedimientos, considerando los siguientes aspectos:

- Necesidades en la normalización de los ensayos.
- Frecuencia y tipo de los análisis solicitados.
- Capacidad y complejidad diagnóstica de los Laboratorios Clínicos.
- Disponibilidad del recurso humano técnico, profesional y especializado.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 20 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

-Críticidad de los ensayos.

Se consolidó un listado final de capítulos a incluir en el manual de microbiología y se realizó una búsqueda de los principales documentos, publicaciones y guías para ser utilizados como insumo en la realización de cada uno de los apartados.

Se adecuaron los procedimientos según los diferentes métodos validados disponibles y posibilidades institucionales para su implementación.

Se realizó la primera redacción de los procedimientos, y posterior a la validación técnica por todos los miembros de la Comisión de Especialistas en Microbiología de la Caja Costarricense de Seguro Social (COMICCSS).

Finalmente se realizó una revisión de pares externos al grupo desarrollador del “Manual de Procedimientos de Bacteriología”, con su consecuente análisis de las observaciones e inclusión de cambios a la versión final.

Responsable del cumplimiento

Microbiólogo encargado y personal a su cargo designado para las diferentes tareas microbiológicas del Laboratorio Clínico.

Responsable de verificar el cumplimiento

Microbiólogo Director de Laboratorio Clínico

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 21 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

CONTENIDO

Módulo 1: Diagnóstico microbiológico de infecciones del tracto urinario: Análisis de urocultivos

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados (1-2)

El urocultivo es el análisis indicado para el estudio de la infección urinaria, este se compone de la identificación del microorganismo y prueba de sensibilidad a los antimicrobianos (PSA). Actualmente, no se recomienda la realización sistemática del urocultivo en mujeres con infección del tracto urinario (ITU) comunitaria no complicada, ya que su etiología y los patrones de sensibilidad a los antibióticos de primera línea son predecibles.

Cuadro 1.1 Definiciones de conceptos importantes en infecciones del tracto urinario (1-3).

Concepto	Definición
Contaminación	Los organismos se introducen durante la recolección o el procesamiento de la orina.
Bacteriuria asintomática (colonización)	Los organismos están presentes en la orina, pero no causan enfermedad ni síntomas. Dependiendo de las circunstancias, la importancia es variable, y el paciente a menudo no requiere tratamiento.
Infección del tracto urinario (ITU)	La combinación de uno o más patógenos dentro del sistema urinario asociado a síntomas y/o respuesta inflamatoria a los patógenos que requiere tratamiento.
ITU no complicada	Infección en una paciente sana, no embarazada y premenopáusica con un tracto urinario sin anomalías estructurales y funcionales.
ITU complicada	Infección asociada con factores de riesgo que aumentan la colonización y disminuyen la eficacia de la terapia, que podrían estar asociadas con anomalías funcionales o anatómicas del tracto genitourinario.
ITU recurrente	Ocurre después de una infección documentada que se resolvió. Definido como 2 o más infecciones en 6 meses, o más de 3 infecciones en 12 meses.
Reinfección ITU	Un nuevo evento con reintroducción de bacterias en el tracto urinario, puede ser la misma especie o diferentes al evento anterior.
ITU persistente	Causada por la misma bacteria a partir del foco de infección.

En contraparte, en ITU complicada y aquella asociada a la atención en salud, el espectro etiológico es amplio y muchos de los patógenos causales desarrollan resistencia a los antibióticos; por lo que, para administrar un tratamiento adecuado se requiere realizar cultivo y antibiograma. Asimismo, se indica el estudio completo ante fallas de tratamiento, recaídas, sospecha de pielonefritis subclínica, infecciones recurrentes o cualquier otro

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 22 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

factor que sugiera una ITU complicada (3). Para mayor comprensión de los diferentes contextos de ITU, el cuadro 1.1 detalla los conceptos importantes del tema.

Es importante mencionar que el urocultivo no está contraindicado durante el ciclo menstrual, por lo que su realización procede de acuerdo con los criterios de ITU previamente establecidos. Además, la prueba se realiza de forma sistemática en gestantes y pacientes que serán sometidos a cirugías y algunos procedimientos urológicos. En este contexto se evalúa la presencia de bacteriuria significativa, siendo de especial importancia la de carácter asintomático.

Los siguientes son los cuadros clínicos más frecuentes que ameritan el análisis de las muestras de orina mediante el urocultivo. Para mayor detalle dirigirse al apartado de definiciones:

- Cistitis
- Pielonefritis
- Epididimitis
- Prostatitis
- Bacteriuria asintomática (Solo en gestantes y pacientes sometidos a cirugías urológicas)

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 23 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, edad, condiciones fisiológicas como embarazo. -Posible diagnóstico o cuadro clínico. Fecha de inicio de síntomas. Terapia antimicrobiana recibida.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. Técnica de obtención de la muestra. Servicio que envía la muestra
Muestras clínicas indicadas	
- Orina a chorro medio (micción media)	- Orina por sonda Foley u otros sistemas de sondaje
- Orina por catéter urinario	- Orina por punción vesical/suprapúbica
Criterios de rechazo	
-Muestras con más de dos horas de recolección	-Muestras recolectadas a partir de la bolsa colectora en pacientes con sonda
-Muestras recolectadas en frascos inadecuados donde no se puede asegurar su esterilidad	-Muestras recolectadas a partir de la bolsa colectora en pacientes pediátricos
-Frascos lavados no estériles	-Muestras abiertas o derramadas
-Duplicado de una muestra recibida en menos de 48 horas	-Puntas de sonda Foley
-Muestras para cultivo por anaerobios (a excepción de orina por punción vesical/suprapúbica)	-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica
-Muestra de orina de 24 horas de recolección	
Observaciones	
-Prostatitis bacteriana: El cultivo de orina requiere protocolos complejos de toma de muestras adicionales, así como exhaustiva información clínica para su interpretación. Por tanto, se recomienda hacer una revisión exhaustiva adicional a este documento en aquellos centros que requieran procesar este análisis.	
Recipiente indicado para la recolección	
-Frasco estéril de boca ancha	
Condiciones de transporte	
-Transportar la muestra de orina al laboratorio inmediatamente después de recolectada. -Si la muestra no puede ser procesada en las próximas dos horas posteriores a su recolección, se puede refrigerar en el Laboratorio Clínico por un tiempo máximo de 24 horas. No se debe congelar. -Si la refrigeración de la muestra no es posible y su transporte al laboratorio no se puede hacer de forma inmediata, esta debe ser recolectada en recipientes que contengan preservantes.	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales para procesamiento de urocultivos

- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar previo a la administración de agentes antimicrobianos. Además, se debe seguir el protocolo de toma de muestra adecuado que minimice la contaminación con microbiota urogenital normal.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 1.2 Equipos e insumos requeridos para realizar urocultivos		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad* Incubadora bacteriológica a 35-37°C	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar MacConkey (MCK)	Reactivos para tinción Gram Asas bacteriológicas de 1µL Asas bacteriológicas de 10µL	Oxidasa Catalasa Coagulasa

*Alternativa: Utilizar lámpara con alcohol o mechero Bunsen

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

1. Seleccione la calibración del asa que corresponda según las condiciones de muestra y lineamientos del centro, se sugiere utilizar asas de 1 y 10µL de forma diferenciada por tipo de muestra (Cuadro 1.3). No se recomienda la siembra de más de una muestra de orina por placa de agar.
2. Verifique la rotulación de la muestra de orina, valide la información.
3. Homogenice la muestra por rotación.
4. Cargue la muestra de orina con el asa de siembra estéril, introduciendo únicamente el extremo circular del asa y retirando de forma vertical.
5. Inocule el COS por medio de una estría y disperse a través de toda la superficie del medio de cultivo para realizar recuento de colonias (Figura 1.1a).
6. Cargue nuevamente el asa de siembra con la muestra y siembre la placa de MCK separando la muestra en zonas para aislar colonias (Figura 1.1b).
7. Incube las placas en aerobiosis a 35-37°C, durante un período mínimo de 18 horas y un máximo de 24 horas para una revisión inicial. Este tiempo puede extenderse hasta 48 horas en los siguientes casos:
 - a. Al observar escaso crecimiento de morfotipos coloniales.
 - b. En muestras de orina recolectadas por técnicas invasivas.
 - c. En muestras de orina de pacientes inmunocomprometidos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 25 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

NOTA: No se recomienda el uso de incubación con CO₂ para urocultivos. En caso de sospecha clínica de uropatógenos poco frecuentes, dirigirse al apartado de análisis e interpretación de cultivos, para tomar las consideraciones necesarias en el procesamiento, incubación y reporte correspondiente.

8. Realice pruebas rápidas de categorización bacteriana como catalasa, coagulasa en lámina o prueba de oxidasa. La tinción de Gram debe utilizarse siempre de forma complementaria, para aclarar la categorización de morfotipos con crecimiento inusual.
9. Realice ID y PSA de acuerdo con los estándares vigentes de CLSI. No realice este procedimiento si el aislamiento es claramente contaminante o se obtiene un cultivo polimicrobiano (3 o más morfotipos coloniales). Remitirse al apartado de “análisis de cultivos” para interpretación del crecimiento en placas.

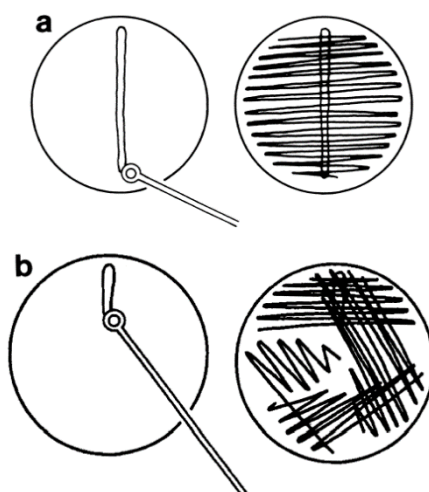


Figura 1.1 Método de siembra de urocultivos a) por estría para agar sangre, b) por rayado en 3-4 zonas para agar MacConkey.

Análisis e interpretación de cultivos

- La orina es un líquido biológico estéril; sin embargo, puede ser fácilmente contaminado con microbiota del perineo, uretra o vagina. Como resultado, el recuento colonial es crítico para establecer la significancia microbiológica de la bacteriuria y los urocultivos siempre se reportan con un recuento colonial asociado (3).
- Para cultivos positivos, examine los medios de cultivo para determinar la cantidad y tipo morfológico de organismos presentes. Para efectos de cuantificación de las colonias en COS debe saberse lo siguiente:

Con un asa de 1μL, cada colonia equivale a 1000 UFC/mL.

Con un asa de 10μL, cada colonia equivale a 100 UFC/mL.

- Las guías clínicas varían en el umbral de recuento de colonias significativo en diferentes situaciones, que van desde $\geq 10^3$ a $\geq 10^5$ UFC/mL dependiendo del contexto (4). En mujeres asintomáticas y premenopáusicas, se puede utilizar el umbral de 10^5 UFC/mL para evaluar el crecimiento bacteriano en la orina evacuada a medio chorro, siendo el punto de corte indicativo de bacteriuria significativa. Recuentos menores puede indicar contaminación. Un umbral inferior de 10^3 UFC/mL es apropiado en individuos sintomáticos tanto en mujeres como en varones.
- Los laboratorios pueden optar por adaptar los criterios de recuento significativo según la edad, sexo, tipo de muestra y presencia de otros factores sugestivos como la piuria. En el Cuadro 1.3 se presenta una sugerencia basada en guías internacionales (3,7-9) y modificado para su adaptación al contexto nacional. El diagnóstico de una infección urinaria requiere evaluar tanto bacteriuria significativa como la presencia de síntomas consistentes con infección del tracto urinario (disuria, urgencia miccional, entre otros). En ausencia de síntomas, los urocultivos positivos representan bacteriuria asintomática y su tratamiento depende de la profilaxis en gestación y ciertas cirugías (5).

Cuadro 1.3 Recuentos bacterianos significativos en urocultivos por tipo de muestras.

Población	Asa indicada	1 uropatógeno Recuento significativo	2 Uropatógenos Recuento significativo
-Orina sonda permanente	1 μL	$\geq 10^4$ UFC/mL de uropatógeno (≥ 10 colonias)	$\geq 10^5$ UFC/mL de cada uropatógeno (≥ 100 colonias)
- Micción media	10 μL*	$\geq 10^3$ UFC/mL de uropatógeno (≥ 10 colonias)	$\geq 10^5$ UFC/mL de cada uropatógeno (crecimiento confluyente de ambos)
-Orina cateterizada -Pediátrica -Punción suprapúbica -Cistoscopías	10 μL*	$\geq 10^3$ UFC/mL de uropatógeno (≥ 10 colonias)	$\geq 10^3$ UFC/mL de cada uropatógenos (≥ 10 colonias)

*Se puede complementar la siembra de un juego de placas adicionales utilizando el asa de 1 μL para resolver recuentos altos que interfieran en la determinación de pureza y aislamiento.

- Además del recuento bacteriano, se debe discriminar el crecimiento de los uropatógenos más comunes sobre otros aislamientos que representan microbiota urogenital normal. El cuadro 1.4 detalla la interpretación de los diferentes microorganismos que se pueden recuperar a partir de las muestras de orina.
- El equipo de trabajo elaborador de este manual, revisó en detalle bibliografía de referencia para el análisis de urocultivo (3,7-9). Se requirió adaptar la interpretación al contexto nacional para elaborar los cuadros 1.3 y 1.4. Se recomienda su empleo en la jerarquización de aislamientos urinarios para el reporte de este análisis.

- Se debe tener en cuenta la posibilidad de aislar uropatógenos infrecuentes. ***H. influenzae/parainfluenzae*** debe sospecharse en niños con anomalías estructurales del árbol urinario, con signos clínicos y paraclínicos sugestivos de ITU, cultivos negativos o fallas terapéuticas. Las muestras deben sembrarse en agar chocolate suplementado e incubar en capnofilia. ***Corynebacterium urealyticum*** debe sospecharse en pacientes con urolitiasis, manipulación urológica o trasplante renal. Este microorganismo crece en COS en aerobiosis (3) formando colonias pequeñas, opacas y puntiformes.

Cuadro 1.4. Principales microorganismos aislados de urocultivos y su interpretación.

Microbiota	Organismo	Extensión del trabajo si el recuento es apropiado
Urogenital	Estreptococo del grupo viridans, <i>Neisseria</i> spp., difteroides, <i>Lactobacillus</i> , anaerobios, <i>Staphylococcus</i> no aureus distinto a <i>S. saprophyticus</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i>	Reporte como microbiota urogenital y solicite nueva muestra. Si se repite el hallazgo, <u>proceda a realizar solo ID y agregue nota (ver en apartado de reportes)</u>
Uropatógenos	Bacilos Gram negativo	Identificación y PSA
	<i>Staphylococcus aureus</i> ¹	Identificación y PSA
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Identificación sin PSA
	Levaduras ²	Identificación sin PSA ⁴
	Estreptococos β -hemolíticos ³	Identificación y PSA
	<i>Enterococcus</i> spp.	Identificación y PSA

1: *S. aureus* puede significar bacteriemia o absceso renal; por lo que, además de informar la identificación y PSA completa, se debe sugerir la toma de hemocultivos (6).

2: El aislamiento de especies de *Candida* a partir de muestras de orina en pacientes sin factores de riesgo es inusual. Sin embargo, en pacientes hospitalizados, especialmente con sonda Foley, diabéticos, con neoplasias, antecedente de uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides, procedimientos urológicos o vaginitis fúngica, recobra importancia y debe ser considerado (6).

3: En gestantes se debe trabajar SGB en cualquier recuento (3). Si se identifica *S. agalactiae*, reportar de acuerdo a lo indicado en el apartado "Reporte de notas complementarias a identificación"

4: La realización de PSA en levaduras debe definirse de acuerdo con el contexto clínico del paciente, valoración del PROA local y Comité de Vigilancia de Infecciones Intrahospitalarias.

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

- Si no se observa crecimiento en el medio de cultivo reportar:
 - "Cultivo negativo por uropatógenos".**
- Si solo se observa microbiota urogenital o colonizantes de piel, reportar:
 - "Crecimiento de microbiota urogenital normal. Se sugiere nueva toma de muestra".**
- Si se observan 3 o más morfotipos coloniales en la placa de cultivo, reportar:

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 28 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- a. **“Muestra contaminada, se sugiere repetir con nueva recolección de muestra”.**

Reporte de resultados positivos

1. Urocultivo positivo con microorganismo de significancia clínica, reportar:

- a. **ID y PSA de acuerdo con los estándares de CLSI vigentes.**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

Reporte de notas complementarias a identificación

1. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* con recuento significativo:
 - a. **“El aislamiento de *S. aureus* en orina sugiere bacteriemia o absceso renal, debe valorarse clínicamente y evaluar la pertinencia de toma de hemocultivos”.**
2. Crecimiento de *Staphylococcus saprophyticus* con recuento significativo:
 - a. **“*Staphylococcus saprophyticus* es sensible a antimicrobianos de primera línea en el contexto de ITU no complicada (excepto fosfomicina), no requiere PSA”.**
3. Crecimiento de *Streptococcus agalactiae* en gestantes cualquier recuento:
 - a. **“El aislamiento de *Streptococcus agalactiae* en muestra de orina de gestantes se considera como tamizaje POSITIVO por este microorganismo. No se requiere realizar adicionalmente el tamizaje con hisopado vaginal-rectal entre las 35-37 semanas de gestación.**
4. Crecimiento de microorganismo de la microbiota urogenital que requirió ID (Cuadro 1.3):
 - a. **“Microorganismo no asociado comúnmente a infección de tracto urinario. Valorar bajo contexto clínico”.**

REFERENCIAS

1. Pigrau, C. (Ed). (2013). *Infección del Tracto Urinario*, Madrid, España: Salvat.
2. Andreu, A., Cacho, J., Coira, A., & Lepe, J. A. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 1, pp. 52-57). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.06.008>
3. Leber, A. L. (Ed.). (2016). *Clinical microbiology procedures handbook* (4th edition). ASM Press.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 29 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: <i>MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023</i>

4. Anger, J., Lee, U., Ackerman, A. L., Chou, R., Chughtai, B., Clemens, J. Q., Hickling, D., Kapoor, A., Kenton, K. S., Kaufman, M. R., Rondonina, M. A., Stapleton, A., Stothers, L., & Chai, T. C. (2019). Recurrent Uncomplicated Urinary Tract Infections in Women: AUA/CUA/SUFU Guideline. *The Journal of Urology*, 202(2), 282-289. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000000296>
5. Hilt, E. E., McKinley, K., Pearce, M. M., Rosenfeld, A. B., Zilliox, M. J., Mueller, E. R., Brubaker, L., Gai, X., Wolfe, A. J., & Schreckenberger, P. C. (2014). Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine Culture Techniques To Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(3), 871-876. <https://doi.org/10.1128/JCM.02876-13>
6. Esparza, G. F., Motoa, G., Robledo, C., & Villegas, M. V. (2015). Aspectos microbiológicos en el diagnóstico de infecciones del tracto urinario. *Infectio*, 19(4), 150-160. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.03.005>
7. Thomas M. Hooton, Suzanne F. Bradley, Diana D. Cardenas, Richard Colgan, Suzanne E. Geerlings, James C. Rice, Sanjay Saint, Anthony J. Schaeffer, Paul A. Tambayh, Peter Tenke, Lindsay E. Nicolle, Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 50, Issue 5, 1 March 2010, Pages 625–663, <https://doi.org/10.1086/65048>
8. Kalpana Gupta, Thomas M. Hooton, Kurt G. Naber, Björn Wullt, Richard Colgan, Loren G. Miller, Gregory J. Moran, Lindsay E. Nicolle, Raul Raz, Anthony J. Schaeffer, David E. Soper, International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 52, Issue 5, 1 March 2011, Pages e103–e120, <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>
9. Lindsay E Nicolle, Kalpana Gupta, Suzanne F Bradley, Richard Colgan, Gregory P DeMuri, Dimitri Drekonja, Linda O Eckert, Suzanne E Geerlings, Béla Köves, Thomas M Hooton, Manisha Juthani-Mehta, Shandra L Knight, Sanjay Saint, Anthony J Schaeffer, Barbara Trautner, Bjorn Wullt, Reed Siemieniuk, Clinical Practice Guideline for the Management of Asymptomatic Bacteriuria: 2019 Update by the Infectious Diseases Society of America, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 68, Issue 10, 15 May 2019, Pages e83–e110, <https://doi.org/10.1093/cid/ciy1121>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 30 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 2: Diagnóstico microbiológico de infecciones gastrointestinales: Análisis de Coprocultivos

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

El estudio de coprocultivos se realiza en el contexto de gastroenteritis, especialmente cuando hay sospecha de implicación bacteriana en el agente etiológico. Las gastroenteritis bacterianas pueden ser desde cuadros agudos autolimitados, hasta cuadros severos que requieren hospitalización. La presentación clínica incluye diarreas persistentes o recurrentes sin causa conocida (1-4).

Las manifestaciones clínicas más destacadas de las gastroenteritis son fiebre, vómitos, dolor abdominal y diarrea moderada a intensa. Las deposiciones son el dato central en la enfermedad diarreica, y su presencia y naturaleza constituyen la base para la clasificación de las infecciones gastrointestinales en dos síndromes: diarrea acuosa o secretora y diarrea invasiva o disentería. Por su parte, la distribución patógenos puede seguir patrones poblacionales, estacionales o asociarse a grupos etarios específicos.

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, edad, Posible diagnóstico o cuadro clínico. Fecha de inicio de síntomas. Terapia antimicrobiana recibida.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. Técnica de obtención de la muestra. Servicio que envía la muestra
Muestras clínicas indicadas	
-Heces diarreicas recolectadas en frasco estéril.	-Volumen mínimo 5mL en adultos.
-Enviar la muestra de heces durante la etapa aguda de la infección (generalmente de 5 a 7 días), ya que los principales enteropatógenos bacterianos reducen su carga con el paso de los días.	
Criterios de rechazo	
-Muestras con más de dos horas de recolección sin evidencia de refrigeración de la misma. Si se procesa, constatar que el retraso puede comprometer la recuperación de los patógenos gastrointestinales.	-Muestras recolectadas en frascos inadecuados donde no se puede asegurar su esterilidad.
-Paciente adulto con más de 3 días de hospitalización (excepto inmunosupresos).	-Paciente pediátrico con más de 4 días de hospitalización (excepto inmunosupresos).
-Muestras de heces formadas.	-Múltiples muestras de heces del paciente enviadas el mismo día.
-Más de 3 muestras del mismo paciente en un período de 3 semanas.	-Muestras abiertas o derramadas.
-Muestras tomadas con hisopos.	-Muestras recolectadas directamente del pañal o papel higiénico
-Muestras para cultivo por anaerobios.	-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 31 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Observaciones
-Definición de heces diarreicas: La OMS define diarrea como tres o más deposiciones al día (o con una frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas. Para efectos del Laboratorio Clínico, se interpreta como muestra diarreica aquella que toma la forma del recipiente que la contiene.
Recipiente indicado para la recolección
-Frasco estéril de boca ancha con tapa hermética
Condiciones de transporte
-Se debe transportar la muestra al Laboratorio Clínico en 2 horas o menos. Si no es posible, debe conservarse en medio líquido Cary Blair a 4°C por un máximo de 24 horas (2). -Si la refrigeración de la muestra no es posible y su transporte al laboratorio no se puede hacer de forma inmediata, esta debe ser recolectada en recipientes que contengan el medio de transporte Medio Cary-Blair modificado en presentación líquida.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de coprocultivos

- Los métodos independientes del cultivo están cada vez más disponibles. Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos varían de un solo complejo a ensayos altamente multiplexados. Es imprescindible comunicarse con el laboratorio para determinar el alcance de las pruebas; especialmente, tener claro los organismos que detecta cada ensayo. Se informa que estos ensayos son más sensibles que el cultivo y han resultado en mayores tasas de detección. Los ensayos multiplex permiten la detección de infecciones mixtas, donde la importancia de cada patógeno debe analizarse con cuidado. Además, los paneles pueden permitir la detección de patógenos como *E. coli* enteroagregativa o sapovirus, donde la indicación para la terapia no está clara. Los métodos independientes del cultivo no deben usarse como prueba de control de tratamiento, ya que detectarán organismos viables y no viables (2).
- El cultivo de muestra de heces en el Laboratorio de Microbiología se debe restringir a la recuperación de: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides*, *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. y *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus* y *V. cholerae*). El complemento diagnóstico se realiza bajo metodologías independientes de cultivo, como inmunocromatografías, tinciones, paneles de detección molecular por PCR, entre otros.
- Los laboratorios de microbiología deben revisar la epidemiología local de las enterocolitis bacterianas e implementar los métodos de cultivo que permita la recuperación de los principales enteropatógenos de la región geográfica. Todos los laboratorios deben analizar de rutina *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides*. Otros patógenos como *Campylobacter* spp., *Vibrio cholerae* y *Vibrio* spp., se cultivan en contextos clínicos específicos. Hay mayor probabilidad de recuperarse si el médico indica la sospecha diagnóstica de acuerdo al historial del paciente (1,3).

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 32 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Es conveniente conservar cualquier remanente de la muestra de heces posterior a su procesamiento, siendo requerida para la realización de verificaciones o estudios posteriores. Se recomienda el uso de medio Cary Blair líquido para conservar el espécimen (2).

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 2.1 Equipos e insumos requeridos para realizar coprocultivos		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ²
Cámara de bioseguridad¹ Incubadora bacteriológica a 35-37°C Vórtex	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF Incubadora bacteriológica a 39°C
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar MacConkey (MCK) Agar Salmonella Shigella (SS) Agar Hektoen (HEK) Agar XLD (XLD)	Asas bacteriológicas Caldo tetratonato (TT) Agares cromogénicos para detección de enteropatógenos² Sistema generador de atmósfera de microaerofilia	Oxidasa Reactivos para tinción Gram Serologías Agar Triple Azucar Hierro (TSI) Agar Urea/Discos

1. Alternativa: Utilizar lámpara con alcohol o mechero Bunsen

2. Según disponibilidad del centro médico

NOTAS: Los caldos de enriquecimiento permite detectar pequeñas cantidades de *Salmonella* spp. o *Shigella* spp. Se ha demostrado el aumento de un 10% en la recuperación de estos enteropatógenos con su uso. Por otra parte, la selección de medios de cultivo selectivos y diferenciales para estas especies no debe limitarse a SS, se sugiere trabajar al menos un medio adicional, como XLD o HEK. Remitirse al cuadro 2.2 para valorar las opciones disponibles y resultados esperados. Por su parte, cuando se requiera elegir medios de cultivos adicionales para la recuperación de otros patógenos según la epidemiología y requisitos de su centro de trabajo, puede remitirse al cuadro 2.3.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 33 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Cuadro 2.2 Medios de cultivo primarios para la detección de *Salmonella* y *Shigella* spp (1).

Medio de cultivo	Aislados esperados	Inhibidores o indicadores	Reacciones de patógenos	Comentarios
Agar Hektoen (HEK)	<i>Salmonella</i> <i>Shigella</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. <i>Plesiomonas shigelloides</i>	Sales biliares, citrato de amonio férrico, tiosulfato de sodio, lactosa, sucrosa, azul de bromotimol, fucsina. <u>Fermentadores:</u> Amarillo-naranja o rosado salmón	<i>Shigella</i> es verde <i>Salmonella</i> es azul o verde; pueden tener centros negros (H₂S). Ambas generalmente son traslúcidas y de bordes no definidos <i>Aeromonas</i> y <i>Plesiomonas shigelloides</i> son verdes	Detecta H₂S. <i>Proteus</i> y <i>Providencia</i> son amarillos o verdes. Puede tener centros negros. <i>Morganella morganii</i> es verde, por lo que se sugiere descartar con prueba de ureasa (positivo). Colonias verdes pueden corresponder a <i>Pseudomonas</i>, por lo que se sugiere descartar con TSI (K/NC) y oxidasa (positivo)
Agar MacConkey (MCK)	Bacilos Gram negativo entéricos	Sales biliares, cristal violeta, lactosa, rojo neutro. <u>Fermentadores:</u> Rojo - rosado	<i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Plesiomonas shigelloides</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i>: Incoloro, transparente o amarillos, cafés puntiformes	Inhibición de un 5% del swarming de <i>Proteus</i> spp. Colonias incoloras, amarillos y cafés pueden corresponder a múltiples géneros, por lo que se debe complementar con otros medios selectivos.
Agar Salmonella-Shigella (SS)	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. <i>Plesiomonas shigelloides</i>	Sales biliares, lactosa, citrato férrico, verde brillante, rojo neutro. <u>Fermentadores:</u> Rojo - rosado	<i>Salmonella</i> (centro negro), <i>Shigella</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp. y <i>Plesiomonas shigelloides</i>. Incoloro o amarillos, cafés puntiformes *Inhibe frecuentemente a <i>Shigella sonnei</i>	Detecta H₂S. Colonias amarillos-incoloras con H₂S pueden ser <i>Citrobacter</i> spp. y <i>Proteus</i> spp., por lo que se sugiere complementar con otros medios selectivos. Es posible descartar <i>Proteus</i> con un repique en COS y demostrar swarming.
Agar Xilosa, lisina, deoxicolato (XLD)	<i>Salmonella</i> spp. y <i>Shigella</i> spp. (Especialmente para <i>Shigella</i> spp.)	Deoxicolato, tiosulfato, citrato de amonio férrico, xilosa, sucrosa, lactosa, lisina, rojo fenol Fermentadores: Amarillo	<i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> son rojas. <i>Edwardsiella</i> y <i>Salmonella</i> pueden ser rojas con centros negros	Detecta H₂S. <i>Providencia rettgeri</i>, <i>Morganella morganii</i> y <i>Proteus</i> spp. son amarillos a pesar de que son negativos a la lactosa.
CHROMagar Salmonella Elite (SM2)	<i>Salmonella</i> spp	Sustrato cromogénico y agentes inhibidores Fermentadores: Celeste-verde	<i>Salmonella</i> produce colonias rosa- púrpura pálido	Detección mejorada con subcultivo y bioquímica frente al uso de agares no cromogénicos. Si a las 24 horas no se observa colonias sugestivas, debe extenderse a 48 horas antes de reportar negativo.

Cuadro 2.3 Medios altamente selectivos para aislamientos de patógenos específicos (1).

Medio de cultivo	Inhibidores/ indicadores	Patógeno seleccionado y descripción de colonia	Observaciones
Agar sangre con ampicilina	20 µL/mL ampicilina	<i>Aeromonas</i> . Colonia oxidasa positivo y puede tener hemólisis.	Aumenta rendimiento de aislamiento
Agar sulfito bismuto	Verde brillante, sulfito-bismuto, sulfato ferroso, dextrosa	<i>Salmonella</i> . Colonia negra con o sin zonas negruzcas o colonia verde sin zonas oscuras	Ideal para <i>Salmonella</i> serovariedad <i>Typhi</i> . <i>Morganella</i> crece verde
Agar verde brillante	Verde brillante, sucrosa, lactosa, rojo fenol	<i>Salmonella</i> . Colonia roja, rosada o blanca rodeada por zona roja	Fermentadores son amarillos- verdosos. Inhibe serovariedades <i>Typhi</i> y <i>Paratyphi</i> .
Agar inositol-verde brillante-sales biliares	Verde brillante, sales biliares, inositol	<i>Plesiomonas shigelloides</i> Colonias blancas a rosadas	Los coliformes son verde o rosados
Cefsulodin-Irgasan- noviobicina CIN	Deoxicolato, cristal violeta, cefsulodin, Irgasan, noviobicina, manitol, rojo neutro.	<i>Yersinia enterocolitica</i> y otras Yersinias. Colonia con centro rojo con halo transparente. <i>Plesiomonas shigelloides</i> <i>Aeromonas</i> spp.	Incubar a 25 °C durante 24 h. Crecimiento de múltiples enterobacterias con el tono rojo. No se recomienda de rutina en zonas con baja incidencia de <i>Yersinia enterocolitica</i> ; sin embargo, facilita recuperación de <i>Aeromonas</i> y <i>Plesiomonas shigelloides</i> .
CHROMagar O157	Sustratos cromogénicos	<i>E. coli</i> O157 produce una colonia púrpura .	Mejora la detección y el flujo de trabajo
MAC-sorbitol con cefixime y telurito	MAC con sorbitol, cefixime y telurito	<i>E. coli</i> O157 Colonia incolora	Mejor selección que el SMAC que también puede ser usado
Caldo MAC	MAC sin agar	VTEC, especialmente cepas NO O157	Use 50 µL de cultivo de toda una noche para realizar EHEC EIA. Puede incubar a 25 °C para enriquecer a <i>Yersinia</i> .
Tiosulfato citrato sales biliares	Bilis, sales, citrato, tiosulfato, NaCl 1%, sucrosa, azul bromotimol	<i>V. cholerae</i> , <i>V. fluvialis</i> y <i>Vibrio</i> <i>furnissii</i> son amarillo ; <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio mimicus</i> y <i>Vibrio hollisae</i> son verde o azul . Algunos <i>Vibrio</i> spp. son inhibidos	<i>Proteus</i> es amarillo; otras bacterias entéricas se inhiben pero si crecen son de azul a translúcido. Los enterococos también pueden crecer. Se requiere incubar 48 horas.
Agua peptonada alcalina	NaCl 1%, pH 8.5	Selecciona <i>Vibrio</i> spp.	Sulcultivar a TCBS a las 24 h. El subcultivar a las 5 h no es necesario ni práctico.
Agar Campylobacter	Atmósfera Microaerofilia 37°C	Selecciona <i>Campylobacter</i> spp Colonia grisácea, translúcidas, brillantes. Semejante a gotas de agua. No hemolíticas	Se requiere incubar 72 horas con revisión cada 24 horas. Subcultivar en COS para identificación.

NOTA: Los serotipos de *E. coli* productoras de diarrea presentan las mismas características bioquímicas que *E. coli* de microbiota comensal, por lo que no es posible aislar selectivamente estos enteropatógenos de un cultivo directo de muestra de heces. El algoritmo de detección de *E. coli* productoras de diarrea utiliza la detección molecular. Por tanto, se restringe a centros con plataforma diagnóstica de PCR. En ausencia de métodos moleculares, las estrategias de aislamiento, identificación y pruebas de susceptibilidad a partir de la

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 35 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

muestra primaria no son recomendables. En casos particulares de alta sospecha clínica, comunicarse con el centro de referencia.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

1. Examine con detenimiento la muestra, seleccione de manera prioritaria aquellas áreas con presencia de moco, pus y/o sangre para los pasos subsecuentes.
2. Realice una preparación al fresco para evaluar la presencia de leucocitos y eritrocitos (utilizar heces frescas). Registrar el hallazgo como parte del análisis.
3. Inocule placas de MCK, SS (directo) con un hisopo estéril. Distribuya la muestra en la primera zona de las placas de agar. Debe cargar el hisopo con muestra entre cada medio de cultivo.
4. Raye el inóculo por dispersión/agotamiento en cuatro zonas utilizando asa estéril.
5. Inocule el caldo de enriquecimiento TT (previamente preparado con solución de yodo) con suficiente muestra (al menos dos cargas del asa de 10µL).
6. Inocule la muestra de heces en los medios de cultivo adicionales seleccionados por el centro de trabajo. Ej: HEK, XLD. No se recomienda utilizar únicamente SS, dado que *Shigella sonnei* se inhibe con frecuencia.
7. Inocule los medios de cultivo y caldos de enriquecimiento seleccionados para el cultivo de patógenos específicos. Se sugiere incluir el cultivo de *Vibrio* spp., en zonas costeras y en situaciones de alta circulación o alerta epidemiológica activada para la región. En cuanto al cultivo de *Campylobacter* spp. se recomienda en zonas de alta incidencia y hospitales con ocupación importante por población pediátrica.
8. Incube los medios anteriores (caldo y placas) en aerobiosis a una temperatura de 35-37°C durante 18-24 horas. El caldo debe colocarse en posición vertical.
9. Tras la incubación, subcultive el TT en los mismos medios selectivos utilizados para la inoculación directa de la muestra. Para este fin homogenice el caldo con vórtex e inocule las placas cargando con asa estéril la porción más superficial del líquido.

NOTA: Si los caldos de enriquecimiento se incuban durante períodos excesivos, las bacterias entéricas pueden sobrecrecer sobre los patógenos e invalidar el valor agregado del procedimiento de enriquecimiento.

Análisis e interpretación de cultivos

1. Revise las placas tras incubación por 18-24 horas (placas primarias y repiques del caldo TT). Evalúe los crecimientos en cada medio de cultivo selectivo en búsqueda de morfotipos sugestivos de acuerdo con lo esperado para los enteropatógenos tamizados. Remitirse a los cuadros 2.3 y 2.4 para el detalle de las características.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 36 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

En caso de observar escaso crecimiento en la primer lectura, se debe incubar 24 horas adicionales.

Salmonella: Crece en MCK, SS, XLD, HEK, SM2

Shigella: Crece en MCK, SS, XLD, HEK, SM2

Aeromonas y Plesiomonas: Crecen en MCK, SS, HEK, Agar COS+Ampi

Campylobacter: Crece en agar selectivo para *Campylobacter* y COS

NOTA: Resguardar todas las placas del coprocultivo hasta su reporte final. Se recomienda en refrigeración de acuerdo con las capacidades del Laboratorio.

2. Seleccione colonias representativas de diferentes medios de cultivo selectivos, incluidas las placas primarias y resiembra de TT.
3. Realice los procesos de repique de colonias sospechosas de acuerdo con los requerimientos de crecimiento y cultivo en COS y MCK. Incube los medios anteriores en aerobiosis a una temperatura de 35-37°C durante 18-24 horas.

NOTAS: El uso de pruebas como TSI, agar urea/prueba de ureasa en disco, oxidasa, serologías, motilidad en medio SIM, entre otros; son complementarias al aislamiento de colonias en los medios selectivos, de forma que dirijan o descarten la presencia de enteropatógenos frente a la microbiota entérica. En caso de no realizarse debe remitirse todas las colonias sospechosas al sistema automatizado de identificación y PSA. El beneficio de usar pruebas bioquímicas se basa en la posibilidad de tamizar diferentes colonias sospechosas, recuperadas de varios medios de cultivo y reducir los procesos de ID y PSA.

A. Colonias sospechosas de *Shigella*, *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* en agar HEK, SS, XLD, MCK:

-Repique en TSI: *Shigella*, *Aeromonas* y *Plesiomonas* son K/A. Se descarta *Pseudomonas* K/NC oxidasa positivo. Posible interferente con *Morganella morganii* K/A.

-Realice prueba ureasa (Disco o agar): *Shigella*, *Aeromonas* y *Plesiomonas shigelloides* son negativo. Se descarta *Morganella morganii* que es ureasa positivo.

B. Colonias sospechosas de *Salmonella* por pigmento negro en agar HEK, SS, XLD:

-Repique en COS: *Salmonella* produce colonias traslúcidas, con extremos no definidos, no produce swarming. Se descarta *Proteus* que produce swarming.

-Realice prueba ureasa (Disco o agar): *Salmonella* es negativo. Se descarta *Proteus* que es ureasa positivo. *Citrobacter* es variable.

C. Colonias sospechosas de *Campylobacter* en agar selectivo:

-Realice oxidasa: *Campylobacter* es oxidasa positivo. Se descarta microbiota entérica que puede sobrepasar los agentes selectivos y la atmósfera de crecimiento.

-Realice tinción Gram modificado: *Campylobacter* es un bacilo Gram negativo curvo en forma de gaviota/ S itálica. Se descarta microbiota entérica que puede sobrepasar los agentes selectivos y la atmósfera de crecimiento.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 37 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

D. Colonias sospechosas de *Vibrio* spp. en agar selectivo:

-Realice oxidasa: Siempre a partir de un repique en COS. *Vibrio* spp. es oxidasa positivo. Se descarta microbiota entérica que puede sobrepasar los agentes selectivos y la atmósfera de crecimiento. Posible interferente *Pseudomonas aeruginosa* que es oxidasa positivo.

-Repique en TSI: *Vibrio* spp. fermenta glucosa. *Vibrio cholerae* es A/A, otros Vibrios son K/A. Se descarta *Pseudomonas* K/NC.

4. Realice identificación y PSA a microorganismos que superen las pruebas de tamizaje para cada enteropatógeno. Utilice aislamientos en COS o MCK. La PSA se interpreta bajo los estándares CLSI vigentes por medio de equipo automatizado y metodología manual.
5. Refiera todos los aislamientos de enteropatógenos al centro referencia para su caracterización epidemiológica.
6. Refiera de urgencia y comuníquese directamente con el centro de referencia para aislamientos de *Vibrio cholerae*. Se requiere determinar oportunamente si corresponde a serotipos epidémicos tipo colérico (01 y 0139) o no colérico.

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

1. Muestra de heces no diarreica, reporte:
 - a. **“Muestra no diarreica. Inadecuada para el análisis de coprocultivo”.**
2. Reporte el resultado negativo informando sobre cada uno de los patógenos que el laboratorio está capacitado para identificar.
 - a. Laboratorios que utilizan MCK, SS y caldo TT, reporte:
 - i. **“Negativo por *Salmonella* sp, *Shigella* spp., *Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides*.”**
 - b. Laboratorios que utilizan MCK, SS, TCBS y caldos TT y Agua peptonada, reporte:
 - i. **“Negativo por *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Aeromonas* sp, *Plesiomonas shigelloides* y *Vibrio* spp.”**
 - c. Laboratorios que utilizan MCK, SS, TCBS, medio Campy, así como caldos TT y Agua peptonada, reporte:
 - i. **“Negativo por *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Aeromonas* sp, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio* sp & *Campylobacter* spp.”**

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 38 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Reporte de resultados positivos

1. Enteropatógenos: ID y PSA de acuerdo con los estándares de CLSI vigentes.

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

2. Reporte la presencia de cualquier patógeno de forma preliminar o confirmatoria. Se sugiere incluya la nota:

a. “Aislamiento referido a centro de referencia para caracterización y vigilancia de serotipos circulantes”.

3. Informe el patógeno con la designación preliminar como "**probable**" hasta que la identificación sea confirmada por las pruebas bioquímicas y la serología cuando corresponda.

4. Informe todos los aislamientos de *Salmonella* como “**Grupo Salmonella**”, hasta contar con la clasificación serológica del centro de referencia.

5. Informe todos los aislamientos identificados en el sistema automatizado como **Shigella group** de la forma: “**Shigella spp.**”, hasta contar con la clasificación serológica del centro de referencia.

6. Remita el reporte confirmatorio a la Comisión Local de Vigilancia Epidemiológica (COLOVE). En especial en aislamientos de *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*.

Reporte de notas complementarias a identificación

1. No se observa crecimiento de enterobacterias, informe:

a. “Ausencia de microbiota entérica normal”.

2. Informe el crecimiento excesivo de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y levaduras en pacientes inmunosupresos como:

a. "Cultivo predominante/puro de [Género-especie del microorganismo]".

REFERENCIAS

1. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818814>
2. Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., III, Theel, E. S., Thomson, R. B., Jr, Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. En Clinical

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 39 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: <i>MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023</i>

Infectious Diseases (Vol.67, Issue 6, pp. e1-e94). Oxford University Press (OUP).
<https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>

3. Vila, J., Álvarez-Martínez, M. J., Buesa, J., & Castillo, J. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 27, Issue 7, pp. 406-411). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.009>
4. John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. (2015). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia, PA :Elsevier/Saunders.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 40 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 3: Detección microbiológica de *Streptococcus agalactiae* (SGB) mediante tamizaje de mujeres embarazadas

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados (1,3)

Streptococcus agalactiae o estreptococo del grupo B (SGB) ha sido reconocido como la principal causa infecciosa de morbilidad y mortalidad perinatal alrededor del mundo. En mujeres embarazadas está asociado con bacteriuria asintomática, infección de tracto urinario y amnionitis. En mujeres que recién concluyen labor de parto, se asocia con endometritis e infección de herida quirúrgica obstétrica.

La sepsis neonatal temprana (durante la primera semana de vida) resulta de la transmisión de SGB durante el parto de la madre al recién nacido. Se caracteriza por septicemia, neumonía o meningitis, y puede resultar en muerte o secuelas neurológicas permanentes.

La sepsis neonatal tardía comprende las infecciones posteriores a la primera semana de vida y hasta el mes cumplido. La bacteria es adquirida en el centro hospitalario y suele asociarse a la atención en salud. Se caracteriza por las mismas consecuencias clínicas que la sepsis neonatal temprana.

Para minimizar la aparición de estos cuadros clínicos, la recomendación es realizar el tamizaje perinatal para detectar la colonización de mujeres embarazadas portadoras de SGB.

Muestras clínicas, transporte y conservación (1-2)

Tabla resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, edad y semana de gestación, historial de alergia severa a penicilina.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. Servicio que envía la muestra. Diagnóstico clínico. Indicación de "urgente" si se encuentra en labor de parto. Terapia antimicrobiana recibida
Muestras clínicas indicadas	
-Hisopado vaginal-rectal en medio de transporte AMIES en gel, con o sin carbón.	
Criterios de rechazo	
-Hisopos sin medio de transporte	-Muestras que han transcurrido más de 24 horas (a temperatura ambiente o en refrigeración) desde la recolección. La posibilidad de aislamiento de este microorganismo decrece a partir de 24 horas, especialmente a temperatura elevada.
-Muestras con rotulación inadecuada o que no coincida con los datos de la orden médica	-Especímenes cervicales, perianales, perirrectales o perineales.
Observaciones	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 41 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

-Se debe tomar la muestra con uno o dos hisopos en un solo tubo de medio de transporte AMIES. No es necesario enviar los hisopos vaginal y rectal por separado.	-No se debe emplear un espéculo para la recolección de la muestra.
Recipiente indicado para la recolección	
-Medio de transporte AMIES en gel con o sin carbón.	-Medio de transporte AMIES líquido.
Condiciones de transporte	
-Se debe transportar la muestra a temperatura ambiente en 2 horas o menos al Laboratorio Clínico -Si la muestra no puede ser enviada inmediatamente, se debe refrigerar a 4°C hasta un máximo de 24 horas -En casos de mujeres que se encuentren en labor de parto, el envío oportuno es de particular importancia para su procesamiento por técnicas de diagnóstico molecular (según capacidad instalada).	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de hisopados por SGB

- El hisopado en busca de estreptococo del grupo B está indicado para mujeres embarazadas durante la semana 35 a 37 de gestación, o aquellas que se encuentran hospitalizadas por labor de parto y no se tiene conocimiento de su estado de colonización por esta bacteria. Se ha demostrado que la profilaxis intraparto con ampicilina puede prevenir la sepsis neonatal temprana en mujeres con cultivos prenatales positivos por SGB y mujeres con ciertos factores de riesgo perinatales (1-2).
- El análisis de SGB por cultivo, involucra un enriquecimiento selectivo en caldo y un repique en agar cromogénico específico para esta bacteria (AGB) (1-2). La identificación de morfotipos bacterianos congruentes con lo indicado por el fabricante para esta bacteria, lleva a un proceso de identificación bioquímica confirmatoria y reporte final. Este resultado tarda de 3 a 5 días.
- Las pruebas moleculares por SGB representan una metodología rápida y altamente sensible en la detección de *S. agalactiae* a partir de hisopados vaginales-rectales. Esto promueve un diagnóstico oportuno para el abordaje terapéutico adecuado y la prevención de sepsis neonatal temprana y tardía. Se utiliza diagnóstico molecular para gestantes que durante el control prenatal no se realizaron la prueba de SGB (2). El cultivo debe realizarse siempre ante la potencial necesidad de PSA. Los resultados del diagnóstico molecular deben interpretarse de forma complementaria al cultivo. **Si se registra una discrepancia entre el método molecular y cultivo, se debe informar siempre como POSITIVO.**

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 3.1 Equipos e insumos requeridos para realizar tamizaje por SGB		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales

Cámara de bioseguridad*		
Incubadora bacteriológica a 35-37°C	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF
Vórtex		Incubadora bacteriológica de CO2 a 37°C
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar cromogénico para estreptococo de grupo B (AGB) Caldo de enriquecimiento selectivo Todd Hewitt (TH)	Medio de transporte AMIES en gel con/sin carbón Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia	Prueba CAMP (Requiere cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923/259213) Técnicas moleculares

*Alternativa: Utilizar lámpara con alcohol o mechero Bunsen

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico (1-2)

1. Verifique la rotulación del tubo con la muestra y valide la información con la solicitud.
2. Las muestras deben procesarse en una cabina de bioseguridad.
3. Inocule el hisopo o los 2 hisopos (cuando se recolectó una muestra vaginal y otra rectal por separado), en un solo tubo de TH.
4. Incube el caldo a 35–37°C en aerobiosis.
5. Subcultive el caldo después de 18–24 horas de incubación en AGB.
6. Incube las placas a 35–37°C en aerobiosis o capnofilia durante 24 horas. Si hay escaso crecimiento o colonias sospechosas, reincube las placas por 24 horas adicionales.
7. Realice ID tras análisis e interpretación del crecimiento en cultivo por medio de identificación bioquímica automatizada, prueba de CAMP o MALDI-TOF (según capacidad instalada). Si se realiza ID bioquímica, repique en medio COS en cultivo puro.
8. Efectúe PSA solamente ante indicación de alergia a penicilinas en la paciente. Su realización debe ser de acuerdo a los estándares vigentes del CLSI.

Análisis e interpretación de cultivos

- o Examine las placas de AGB en busca de colonias sospechosas de *S. agalactiae*, según las especificaciones del fabricante. En el COS, las colonias se observan

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 43 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

redondas, grises y translúcidas con una pequeña zona de beta-hemólisis (también se han descrito cepas no hemolíticas) (2).

- La PSA se indica solamente en caso de pacientes con reacciones alérgicas severas a la penicilina, indicado en la solicitud de análisis microbiológicos. Reporte el resultado del antibiograma para clindamicina (interpretando adecuadamente el resultado de la resistencia inducible), como opción terapéutica alternativa. La realización de PSA se sugiere en centros donde no se tenga evidencia de la tasa de resistencia local a clindamicina. El reporte de vancomicina se debe realizar solo en caso de resistencia a clindamicina.
- Realice la detección molecular de SGB por la técnica establecida en el Laboratorio Clínico y según las especificaciones del fabricante, particularmente a aquellas pacientes sin estatus de colonización y en labor de parto.

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

1. Si no se evidencia crecimiento de colonias sospechosas en el AGB, reporte:
 - a. **“Tamizaje negativo por *Streptococcus agalactiae*”.**
2. En el caso de un resultado negativo mediante la técnica de diagnóstico molecular, reporte:
 - a. **“NO DETECTADO”.**

Reporte de resultados positivos

1. Si se detecta *S. agalactiae* por el método de identificación automatizada o pruebas bioquímicas mínimas (CAMP), reporte:
 - a. **“Tamizaje positivo por *Streptococcus agalactiae*”.**

Reporte de PSA: La interpretación del antibiograma se realiza bajo los estándares de CLSI vigentes, los puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.
2. En el caso de un resultado positivo mediante la técnica de diagnóstico molecular, reporte:
 - a. **“DETECTADO”.**

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 44 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Reporte de muestras inadecuadas

1. En caso de que no se evidencie turbidez en el caldo TH o algún crecimiento en placa en el AGB, tras una extensión de 24 horas adicionales de incubación, reporte:
 - a. **“Muestra no valorable, no hay crecimiento de microorganismos. Se sugiere nueva muestra”.**
2. En caso de obtener un resultado NO DETECTADO en técnicas moleculares y no se evidencie turbidez en el caldo TH o algún crecimiento en placa de AGB, se debe sustituir o aclarar el reporte de la prueba molecular. Reporte:
 - a. **“Muestra no valorable, no hay crecimiento de microorganismos por cultivo. Se sugiere nueva muestra”.**

REFERENCIAS

1. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818814>
2. Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
3. American Academy of Pediatrics. (2021). Kimberlin DW, Barnett E.D., Lynfield R., Sawyer M.H., (Eds). Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics. <https://doi.org/10.1542/9781610025782>

Módulo 4: Diagnóstico microbiológico de sepsis: Análisis de Hemocultivos

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

En condiciones normales la sangre es estéril; sin embargo, cuando se presentan infecciones sistémicas o localizadas severas, un microorganismo puede ingresar al torrente sanguíneo. En la mayoría de ocasiones, las bacterias son eliminadas rápidamente por el sistema inmune; pero en algunos casos, donde la infección es de origen endovascular o la carga bacteriana es alta, el sistema inmune es incapaz de eliminar la bacteria del torrente sanguíneo ocasionando una infección en este nivel (1).

El hemocultivo se emplea para evidenciar un proceso infeccioso en el torrente sanguíneo (cuadro 4.1). Se conoce que estas infecciones se asocian con tasas de mortalidad entre un 10-30%, por lo que recibir soporte hemodinámico, determinar el agente etiológico y administrar antibióticos correctamente, es de vital importancia en la práctica clínica (2).

Cuadro 4.1. Definiciones de conceptos importantes en el diagnóstico de sepsis (2)

Concepto	Definición
Bacteriemia	Presencia de bacterias en la sangre.
Sepsis	Complicación ocasionada con una respuesta inmunitaria no regulada, que conlleva a disfunción orgánica. Puede ocurrir con o sin infección sanguínea, registra mortalidad del 10%. <u>Signos:</u> fiebre, aumento de presión arterial, frecuencia cardíaca y respiratoria aumentada, escalofríos, confusión y desorientación.
Shock séptico	Cuadro de sepsis que se acompaña de anomalías circulatorias, celulares y metabólicas, hay presencia de falla multiorgánica que cursa con hipotensión persistente e hipotermia. Alta mortalidad (40%).
Hemocultivo	Cultivo de sangre de un paciente con sospecha de infección en torrente sanguíneo, que es inoculado en <u>una</u> botella que contiene un medio líquido especializado para el crecimiento óptimo bacteriano.
Set de hemocultivo	Muestra sanguínea obtenida de una misma punción, distribuida en 2 frascos, uno para aerobios y uno para anaerobios*
Serie de hemocultivos	Dos o tres sets de hemocultivos tomados de distintos sitios anatómicos en un corto periodo de tiempo.

*Algunos autores recomiendan dos frascos aerobios.

Actualmente no existen signos clínicos que sean predictores ideales de infección en torrente sanguíneo; sin embargo, hay algunos criterios que han demostrado correlación con procesos sépticos o cuadros infecciosos, entre ellos:

- Criterio SIRS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, por sus siglas en inglés) ha demostrado alta sensibilidad, aunque baja especificidad.
- Score denominado qSOFA ('quick Sequential Organ Failure Assesment') que identifica a pacientes en riesgo de sepsis.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 46 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Criterio Shapiro
- Valores anormales de biomarcadores predictores de un proceso séptico.
- En sospecha de endocarditis infecciosa

La última se refiere a la infección en válvulas cardíacas y/o otras áreas del endocardio, donde se genera un daño y depósito de material compuesto por plaquetas, fibrina y microorganismos (vegetaciones infectadas). Puede ocurrir en zonas con defectos congénitos, degeneración de válvulas debido a la edad, prolapsos valvulares o por el uso de válvulas prostéticas (2-3).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, edad, diagnóstico de base o cuadro clínico. Fecha de inicio de síntomas. Terapia antimicrobiana recibida
Datos de la muestra	Fecha y hora de la toma de muestra. Técnica de obtención de la muestra. Servicio que envía la muestra
Muestras clínicas indicadas	
-Sangre venosa periférica, obtenida ya sea por venopunción o por extracción de sangre a través de catéter.	
Criterios de rechazo	
-Muestras obtenidas con anticoagulante (diferente de SPS que tiene la botella). El EDTA es un fuerte inhibidor de crecimiento bacteriano; por tanto, no se puede trasvasar contenido de tubos EDTA.	-Fascos dañados, rotos, en mal estado o cumplida su fecha de expiración (cubriendo 5 días adicionales que se incubará en el laboratorio).
-Muestras coaguladas*.	-Fascos de hemocultivo entregados 12 horas posterior a la toma de la muestra*.
-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica*.	-Fascos sin rotulación*.
Observaciones	
*-Si los fascos recibidos en el laboratorio no cumplen los criterios de aceptación, pero por la criticidad de la muestra, se recomienda procesar los fascos y siempre indicar la anomalía presentada en el reporte final.	-El volumen de sangre es el factor más importante para aumentar el rendimiento diagnóstico del hemocultivo, por lo que el Colegio Americano de Patólogos recomienda que el laboratorio disponga de un sistema para medir este parámetro (4).
-En aquellos casos donde se reciba la botella de hemocultivo entre las 4 y 12 horas posterior a su recolección, se debe verificar el estado de crecimiento de microorganismos previo al ingreso del equipo automatizado. Para este fin, verifique el indicador del frasco (en metodologías REDOX), realice tinción Gram y subcultive.	
Recipiente indicado para la recolección	
-Toma con jeringa y aguja para su trasvase inmediato en fascos de hemocultivo.	
Condiciones de transporte	
-Las botellas de hemocultivo deben transportarse al Laboratorio Clínico lo más pronto posible a temperatura ambiente; idealmente en un tiempo menor de 2 horas luego de inoculada la botella para su incubación a 35-37°C. De esta manera, evitar retrasos en la detección o impedir el crecimiento de los microorganismos (2,5).	

Los equipos automatizados utilizan señales basales para detección de crecimiento bacteriano, por lo que el retraso en su ingreso al sistema, puede ocasionar lecturas erróneas de señales basales y positividad (5).

Volumen de muestra indicado

Pacientes adultos (1): Se recomienda tomar el volumen indicado para 2-3 botellas por punción (set) en dos sitios anatómicos (serie de hemocultivos).

Distribución del volumen por botella:

-20 mL extraídos: Un hemocultivo aerobio y otro hemocultivo anaerobio. Cada botella debe ser inoculada con 10mL de sangre periférica.

-30 mL extraídos: Dos botellas para hemocultivo aerobio y otra para hemocultivo anaerobio. Cada botella debe ser inoculada con 10mL de sangre periférica.

Pacientes pediátricos (2,9): El volumen y número de muestras a obtener depende del peso del paciente (ver cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Volúmenes de sangre recomendados para hemocultivos en pediatría (1,5).

Peso del paciente (kg)	Total del volumen del paciente (mL)	Punción venosa	Volumen de sangre recomendado		Volumen total recolectado (mL)
			Set 1	Set 2	
≤ 1	50-99	1 sitio	2	-	2
1.1-2	100-200	2 sitios	2	2	4
2.1-12.7	> 200	2 sitios	4	2	6
12.8-36.3	> 800	2 sitios	5	5	10
>36.3*	> 2200	20-30	20-30	20-30	40-60

* A partir de 36.3kg se trata como adultos para la toma de muestra y selección de botellas aerobio - anaerobio

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de hemocultivos

- El procesamiento de hemocultivos requiere de equipo automatizado para la incubación, siendo los métodos manuales insuficientes para el diagnóstico oportuno. Se debe realizar reportes preliminares de hemocultivos positivos a partir de la observación al Gram, crecimiento en medios de cultivo sólidos y pruebas complementarias disponibles localmente. Las herramientas de diagnóstico molecular se conjugan a partir de botellas con detección inicial de crecimiento por el equipo automatizado.
- El volumen de muestra inoculada en las botellas, es la variable más importante para el rendimiento del hemocultivo (5-6). El Laboratorio Clínico debe establecer medidas para controlar y registrar este punto. Si el volumen es subóptimo, se recomienda participar activamente en la comunicación a los servicios y capacitación continua.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 48 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Se debe trabajar en todo momento dentro de la cámara de bioseguridad, siendo que hay exposición a microorganismos infecciosos por producción de aerosoles. Estos se generan de forma regular en la manipulación y trabajo de botellas de hemocultivo (5).
- Sólo se recomienda la extracción a intervalos cuando se documenta una bacteriemia persistente (endocarditis infecciosa o infección asociada a catéter).
- Se recomienda repetir hemocultivo después de 24-48 horas si se desconoce el foco infeccioso y primera serie de hemocultivos es negativa.
- El control de hemocultivo antes de las 48 horas puede arrojar resultados falso positivo.
- Finalmente, el hemocultivo es una prueba crítica que debe informarse su avance en todo momento. Consecuentemente se requiere atención directa a este proceso en los 3 turnos y 7 días de la semana (5-6). Esto incluye el ingreso al sistema automatizado de nuevas botellas, procesamiento de hemocultivos positivos cuando alerte el sistema, así como el informe de resultados preliminares.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 4.1 Equipos e insumos requeridos para realizar hemocultivos		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ³
Cámara de bioseguridad	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF
Incubadora bacteriológica a 35-37°C	Analizador automatizado de hemocultivos ¹	Incubadora bacteriológica de CO ₂ a 37°C
Microscopio de luz		
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS)	Asas bacteriológicas	
Agar Chocolate (ACH)	Sistema generador de atmósfera de capnofilia	Oxidasa
Agar MacConkey (MCK)	Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis ³	Catalasa
Agar Manitol Sal (MSA)	Tubos al vacío con gel separador	Coagulasa en lámina
Botellas hemocultivo adulto aerobios ²	Portaobjetos	Reactivos para tinción Gram
Botellas hemocultivo adulto anaerobios ²	Alcohol de 70%	Técnicas moleculares ³
	Aguja doble o jeringa	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 49 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Botellas hemocultivo Pediátricas² Agares cromogénicos para detección de resistencias³		
---	--	--

1. No es recomendable el procesamiento de hemocultivos manuales, ya que no permiten monitorización continua, así como agitación constante, estos deben sustituirse por equipos automatizados.
2. Deben contener resinas, para contrarrestar altas cargas de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos
3. Según disponibilidad del centro

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

1. Verifique la integridad de la botella de acuerdo con las características indicadas por la marca (revisión del volumen de llenado, indicador óxido reducción en el fondo de la botella, fecha de vencimiento, buen estado general).

2. Ingrese las botellas de hemocultivo al sistema automatizado.

NOTA: A partir de este momento se mantiene la incubación hasta 5 días. Prolongue la incubación si se sospecha de bacterias fastidiosas de lento crecimiento, como *Nocardia*, *Legionella*, *Kingella* así como hongos dimórficos hasta 10 días, realizando un repique sub terminal al día 7-8 para aumentar la recuperación. Para *Bartonella* e *Histoplasma capsulatum* se requiere procesos de lisis centrifugación. Para *Brucella* se sugiere incubar por un máximo de 21 días. Para *Francisella* se requiere incubar por 14 días con repiques ciegos cada 4 días (2,5).

No es necesario ni justificado realizar subcultivo de hemocultivos negativos en sistemas automatizados de forma sistemática.

3. Hemocultivos positivos (2,5):

- a. Extraiga la botella del equipo automatizado y registre el tiempo de positividad en horas.

NOTA: Se sugiere revisar la gráfica de parámetros y valorar el patrón de progresión. Generalmente el crecimiento microbiológico se acompaña de una curva exponencial.

- b. Desinfecte el tapón de hule de la botella con alcohol e inserte la aguja doble o jeringa con aguja.
- c. Coloque 1-2 gotas sobre un portaobjetos y disperse por extendido. Deje secar al aire (no colocar en plancha). Fije con metanol.
- d. Realice tinción de Gram.
- e. Interprete de inmediato el resultado y realice un reporte preliminar del cultivo con lo observado en el Gram.

Cuadro 4.2 Procesamiento inicial de hemocultivos positivos a partir de la observación de tinción Gram (2,5)

Tinción de Gram		Medios de cultivo				
		COS	ACH	MCK	MSA	Especiales ¹
BOTELLA AEROBIOS y ANAEROBIOS ²	Cocos Gram positivo en racimos o grumos	X	X		X	Agar MRSA
	Cocos Gram positivo en pares y/o cadenas	X	X			Agar para el aislamiento de SGB y VRE
	Bacilos Gram negativo	X	X	X		Agar ESBL/ Carba
	Bacilos Gram positivo cortos	X	X			--
	Bacilos Gram positivo largos	X	X			--
	Cocos Gram negativo	X	X	X		Agar Thayer-Martin
	Levaduras	X	X			Agar Sabouraud / Agar cromogénico de <i>Candida</i>
BOTELLA ANAEROBIOS	Morfotipos inusuales, con alta sospecha de etiología anaerobia	X	--			Agar Brucella

- Según disponibilidad en cada centro de trabajo.
- La botella de anaerobios se trabaja de base de la misma forma que la botella de aerobios. Se replica en los medios convencionales de acuerdo a lo observado en la tinción de Gram, ya que generalmente se recuperan los principales microorganismos facultativos causantes de sepsis a partir de botella anaerobia.
- Si la información preliminar de la tinción de Gram no es claro y concluyente: proceder con la siembra sistemática en COS, ACH, MSA, MCK.
- Si en el centro están disponibles los métodos moleculares, se sugiere incluir medios específicos de acuerdo con lo detectado en la botella positiva.
- Si en el Gram se observa bacilos Gram negativo curvos sugestivos de *Campylobacter* spp.: Sembrar en COS e incubar en microaerofilia.

NOTA: En caso de no observar microorganismos en la tinción Gram, centrifugue una alícuota de 8mL en tubo con gel separador por 10 min a 1400 g para obtener el inóculo. Descarte el sobrenadante y repique en COS + ACH a partir del material remanente sobre el gel. Puede repetir el Gram de este preparado. Reingrese la botella al equipo automatizado. Generalmente se debe a falsos positivos por leucocitosis o bajos recuentos de levaduras.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 51 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- f. Informe al servicio donde se encuentre el paciente lo observado en Gram, tiempo de positividad, número de botellas positivas y sitio anatómico. Ej: Hemocultivo positivo a las 12 horas de incubación (1/2 botellas: CVC), se observa bacilos Gram negativo.
- g. Realice subcultivos en placas según lo observado en la tinción de Gram (Ver cuadro 4.2). La siembra debe realizarse por dispersión/agotamiento en los cuadrantes con el fin de aislar las colonias.
- h. Incube las placas a 35-37°C, proporcione atmósfera de capnofilia para los medios que contengan sangre (COS-ACH).
- i. Incube en anaerobiosis una placa de COS y Agar Brucella si la botella implicada es anaerobia y existe alta sospecha que el morfotipo observado corresponde a bacterias anaerobias.

NOTA: En caso de contar con 2/2 botellas positivas y observar bacilos Gram negativo, se sugiere realizar ID y PSA preliminar mediante lisis centrifugación de una alícuota del hemocultivo. Utilizar tubos con gel separador y centrifugar por 10 min a 1400 g para obtener el inóculo. Alternativamente, es posible realizar el subcultivo en placa de COS e incubar por 5 horas, posteriormente realizar ID y PSA preliminar del crecimiento incipiente (pátina).

4. Trabaje todas las botellas del set, ya que pueden existir coinfecciones con diferentes microorganismos o la misma especie con distintos patrones de resistencia a los antimicrobianos.
5. Hemocultivos negativos:
 - a. Retire la botella del equipo automatizado al término de la incubación.
 - b. Reporte el hemocultivo como negativo.

Análisis e interpretación de cultivos (2,5,6,7)

1. Revise las placas de los subcultivos de hemocultivos positivos a las 18-24 horas.
2. Reincube las placas de COS y ACH si no se observa crecimiento. No descarte las placas antes de 48 horas.
3. Describa las características y morfologías coloniales en los diferentes medios de cultivo.
4. Revise e interprete el crecimiento en medios cromogénicos según corresponda, actualice los reportes preliminares. Ej: Crecimiento de BGN fermentador BLEE negativo.
5. Realice identificación y PSA a microorganismos con significancia clínica en bacteriemia. Los principales microorganismos causantes de bacteriemias se

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 52 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

encuentran en los cuadros 4.3-4.4-4.5. La PSA se interpreta bajo los estándares CLSI vigentes por medio de equipo automatizado. Se pueden realizar pruebas moleculares si se encuentran disponibles localmente.

6. El estudio de bacteriemias y sepsis en pacientes con colocación de catéteres, requiere la interpretación conjunta de muestras tomadas en vías periféricas y a través de catéter cuando este es fijo; o bien, muestras de sangre periférica y cultivo de punta de catéter cuando este es removible. Remitirse a cuadros 4.6-4.7 para su análisis.

Existe gran cantidad de especies de microorganismos que pueden causar infección en torrente sanguíneo, por lo que cualquier crecimiento es el potencial causante de infección y debe realizarse ID y PSA, a menos que se sospeche de contaminación de la muestra por flora de piel (mala toma de muestra) o contaminación del catéter. En estos casos, siempre y cuando se cuente con solo una botella positiva, proceda con identificación sin PSA.

Sospecha de contaminantes en hemocultivos obtenidos de punción venosa periférica:

Aislamiento de los siguientes microorganismos: *Bacillus* spp. - *Cutibacterium acnes* - *Staphylococcus* coagulasa negativos (excepto en neonatos) - *Micrococcus* spp. - *Corynebacterium* spp. - *Lactobacillus* spp.

En dichos casos, se recomienda comentar caso con médico tratante o encargado de enfermedades infecciosas y reportar como contaminado por hallazgo.

Cuadro 4.3 Significancia clínica de los principales microorganismos aislados en hemocultivos (8-9)

Categoría A: Nunca son contaminantes
<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Bacteriodes</i> spp. <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Capnocytophaga</i>
Categoría B: Raramente son contaminantes
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> Enterobacterales <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Candida albicans</i> <i>Enterococcus</i> spp.
Categoría C: 50% son contaminantes
Estreptococos grupo viridans <i>Clostridium</i> spp.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 53 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

<i>Candida tropicalis</i>
Categoría D: La mayoría son contaminantes
SOSA <i>Bacillus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp. Otros bacilos gram negativo no fermentadores Difteroides <i>Cutibacterium acnes</i>

Cuadro 4.4 Microorganismos más frecuentes causantes de infección en torrente sanguíneo por grupo de pacientes (2,9).

Condición	Microorganismo
Sepsis neonatal (temprana y tardía)	Estreptococos beta-hemolíticos, en particular del grupo B de Lancefield. Enterobacterales, principalmente <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. Levaduras
Inmunocompetentes Comunitarias	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Enterobacterales <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Neisseria meningitidis</i>
Inmunocompetentes Nosocomiales	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Enterobacterales <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus</i> spp. Anaerobios <i>Streptococcus pneumoniae</i> Levaduras SOSA
Niños	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> no tipo B <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Endocarditis infecciosa	Estreptococos del grupo viridans <i>Staphylococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Streptococcus gallolyticus</i> Miembros del grupo HACEK

Cuadro 4.5 Microorganismos fastidiosos e inusuales asociados a bacteriemia (2,5).

Microorganismo	Requerimientos especiales
<i>Abiotrophia</i> y <i>Granulicatella</i>	Medio suplementado con piridoxal o cisteína. Crece como colonias satélites alrededor de <i>Staphylococcus</i> . Puede aislarse de ACH
<i>Bartonella</i>	Cultivar en ACH a 35 °C en capnofilia por 14-21 días. Métodos moleculares para diagnóstico.

<i>Brucella y Campylobacter</i>	Con los métodos automatizados se recuperan a los 2-3 días de incubación.
<i>Francisella</i>	Especial cuidado en el Gram por característica pleomórficas. Algunas solo crecen en ACH.
Grupo HACEK	Cultivos positivos a los 3.5 días. Si cultivos son negativos a los 5 días y existen altas sospechas de endocarditis por HACEK ampliar tiempo de incubación.
<i>Helicobacter</i>	Puede ser detectado a partir del tercer día de incubación. Para óptima recuperación se debe extender tiempo de incubación a 7 días.
<i>Legionella</i>	Bacteriemias secundarias a trasplante renal, válvulas prostética o neumonías. Necesario medio BCYE.
<i>Leptospira</i>	Utilizar otros métodos diagnósticos de laboratorio como serología.
<i>Mycoplasma</i>	Necesario medio SP4. Aislamientos fortuitos de <i>M. hominis</i> en hemocultivos.

Sospecha de contaminantes en hemocultivos obtenidos de catéter venoso central:

Cuadro 4.6 Método apropiado para casos donde se requiera conservar el catéter (2):

Hemocultivos periféricos	Hemocultivo del Catéter Central	Sospecha de BAC
+ ^a	+ ^a	+ ^b
+	+ (≤120 min antes del cultivo periférico) ^c	+ ^b
-	+	Inconcluso ^d
+	-	Inconcluso ^e
-	-	-

^a Positivos con el mismo m.o. (ID y PSA)

^b Sugestivo de BAC (bacteremia asociada a catéter) en ausencia de otra fuente identificable de infección

^c Diferencias menores de 120 minutos pueden ser sugestiva de BAC cuando aislamientos son positivos para el mismo m.o. (ID y PSA)

^d Sugiere colonización de catéter o contaminación en la toma de muestra

^e Sospecha de BAC si aislamiento es positivo por *S. aureus* o *Candida* spp., en ausencia de otra posible fuente de infección.

Cuadro 4.7 Método en caso de remoción de catéter sospechoso de fuente de infección (2)

Hemocultivos periféricos	Hemocultivo del Catéter Central	Sospecha de BAC
+ ^{a, b}	+ ^a	+
+	-	Inconcluso ^c
-	+	Sugestivo de colonización de catéter
-	-	-
+ ^{a, b}	+ ^a	+

^a Positivos con el mismo microorganismo,

^b uno o dos sets de hemocultivos positivos,

^c sugestivo de BAC si aislamiento + es por *S. aureus* o *Candida* spp, en ausencia de otra fuente identificable de infección.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 55 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

1. Si la botella completa la incubación requerida y no hubo positividad, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo a los 5 días de incubación”.**
2. Valorar la inclusión de reportes preliminares a las 24 y 48 horas de incubación, de acuerdo al contexto y posibilidades de cada centro. Reporte de la siguiente forma:
 - a. **“Cultivo negativo a las 24 horas de incubación”.**
 - b. **“Cultivo negativo a las 48 horas de incubación”.**

Reporte de resultados positivos

1. Hemocultivo contaminado con microorganismo del grupo C y D, reporte como se indica en a ó b, según la cantidad de botellas tomadas:
 - a. **[ID del microorganismo]. “Positivo 1 de 2 botellas del set, aislamiento no necesariamente indica infección. Probable contaminante”.**
 - b. **ID del microorganismo]. “Positivo a partir de la(s) botella(s) obtenida(s) de un solo sitio anatómico, aislamiento no necesariamente indica infección. Probable contaminante”.**
2. Hemocultivo positivo con microorganismo de significancia clínica. Botellas del set con microorganismo de los grupos A-B, reporte:
 - a. **ID y PSA de acuerdo con CLSI vigente + [Tiempo de positividad en horas]**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

Reporte de notas complementarias a identificación

1. Si se recibe botellas de un solo sitio anatómico, reporte:
 - a. **“Recepción de muestras tomadas del mismo sitio anatómico: La muestra de hemocultivo idónea requiere la extracción de sangre en dos sitios anatómicos distintos para la correcta interpretación de la prueba”.**

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 56 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

2. Si se recibe una botella que no alcanza el mínimo requerido del volumen de sangre:
 - a. **“Volumen insuficiente lo cual puede disminuir la sensibilidad analítica de la prueba. El volumen mínimo requerido por botella es 10 mL en adultos. Se sugiere repetir recolección de la muestra”.**
3. Si se recibe una botella con que sobrepasa la cantidad máxima requerida de sangre:
 - a. **“Volumen excesivo lo cual puede generar falsos positivos o negativos”.**
4. Aislamiento de *Streptococcus gallolyticus* en el hemocultivo, reporte:
 - a. **“El aislamiento de *Streptococcus gallolyticus* se asocia a carcinoma de colon. Se sugiere valorar factores de riesgo del paciente”.**

REFERENCIAS

1. Ombelet, S., Barbé, B., Affolabi, D., Ronat, J.-B., Lompo, P., Lunguya, O., Jacobs, J., & Hardy, L. (2019). Best Practices of Blood Cultures in Low- and Middle-Income Countries. En *Frontiers in Medicine* (Vol. 6). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00131>
2. Guna Serrano, M. R., Larrosa Escartín, N., Marín Arriaza, M., & Rodríguez Díaz, J. C. (2019). Diagnóstico microbiológico de la bacteriemia y la fungemia: hemocultivos y métodos moleculares. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 37, Issue 5, pp. 335-340). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.03.005>
3. Fitzsimmons, K., Bamber, A. I., & Smalley, H. B. (2010). Infective endocarditis: changing aetiology of disease. En *British Journal of Biomedical Science* (Vol. 67, Issue 1, pp. 35-41). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.1080/09674845.2010.11730290>
4. Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., III, Theel, E. S., Thomson, R. B., Jr, Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. En *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 67, Issue 6, pp. e1-e94). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
5. Leber, A. L. (Ed.). (2016). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/97815558188146>.
6. Lamy, B., Dargère, S., Arendrup, M. C., Parienti, J.-J., & Tattévin, P. (2016). How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00697>
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (2011). *Principles and procedures for Blood Cultures; Approved Guideline*. CLSI document M47-A. ISSN 0273-3099
8. Soloaga, R. Guelfand, L. (2022). *Curso de Microbiología: Hemocultivos, sepsis y endocarditis*. Argentina: <https://cababc.org.ar/diagnostico-microbiologico/>
9. Paolucci, M., Landini, M. P., & Sambri, V. (2012). How Can the Microbiologist Help in Diagnosing Neonatal Sepsis? En *International Journal of Pediatrics* (Vol. 2012, pp. 1-14). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2012/120139>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 57 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 5: Diagnóstico microbiológico de infecciones del sistema nervioso central: Análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR)

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Las infecciones del sistema nervioso central se clasifican principalmente en meningitis, encefalitis, tromboflebitis séptica, abscesos cerebral y epidural y empiema subdural (4).

El sistema nervioso puede infectarse por diferentes microorganismos, incluyendo bacterias, virus, hongos, protozoos y helmintos. La presentación clínica de estas infecciones puede ser aguda, subaguda o crónica dependiendo de la etiología, la virulencia del microorganismo y la localización del proceso infeccioso. En ocasiones se afecta un único órgano o compartimento como en el caso del absceso cerebral o la meningitis, y en otros se afectan varios de ellos como en las encefalomielitis o las meningoencefalitis. Los agentes infecciosos pueden invadir los órganos diana a partir de un foco infeccioso cercano, como una otitis, por vía hematógena, siguiendo diversas vías nerviosas, o bien, ayudados por la existencia de sistemas de derivación del líquido cefalorraquídeo (LCR) colocados en intervenciones de neurocirugía (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de toma de muestra, sitio de recolección (punción lumbar, reservorio, drenaje o derivación ventricular). Número de tubo de recolección (1-2-3-4). Fecha de inicio de síntomas.
Muestras clínicas indicadas	
-LCR obtenido por punción lumbar realizada por el personal médico	-LCR a partir de dispositivos implantados desde el sistema nervioso central: -Reservorio de Ommaya -Derivación ventrículo auricular -Derivación ventrículo peritoneal (3).
Criterios de rechazo	
-Dado el carácter crítico de la muestra, no existen criterios de rechazo en muestras de LCR. En caso de no contar con algún dato de los mencionados, el personal del laboratorio está en obligación de llamar al servicio y recabar la información faltante (3).	-Frascos de boca ancha. Alto riesgo de contaminación. En caso de recibirse, indicar al servicio y prevenir que se repita en otro proceso de recolección de LCR. Se deberá trabajar y anotar en el reporte la limitación del estudio con el recipiente.
-Especímenes enviados en jeringa.	-Recipiente no estéril.
Observaciones	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 58 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

-El LCR debe ser tomado siempre que sea posible previo a la administración de antibióticos, ya que se inhiben los microorganismos tan solo una hora después de iniciada la terapia antimicrobiana, lo cual afecta la recuperación del patógeno en cultivo y su observación en la tinción de Gram.
Recipiente indicado para la recolección
-Tubo estéril con tapa de rosca.
Condiciones de transporte
-El transporte de muestras de LCR al Laboratorio Clínico debe ser inmediato (≤ 15 min) a temperatura ambiente. -No se debe refrigerar la muestra ya que afecta la recuperación de bacterias (2,3). -Las muestras deben procesarse de forma inmediata (3).

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de LCR

- o La meningitis bacteriana aguda es una afección médicamente urgente que requiere la instauración inmediata de una terapia antimicrobiana apropiada. Las anormalidades del LCR asociadas con esta condición típicamente incluyen: elevación de las proteínas totales, glucosa disminuida en comparación con el nivel en suero y un recuento elevado de glóbulos blancos con predominio de polimorfonucleares (1).
- o Aunque los anaerobios rara vez causan meningitis bacteriana aguda, se debe realizar un cultivo de LCR para anaerobios en pacientes con una infección parameningea, particularmente en los casos en los que ha habido fuga o ruptura en el espacio cerebroespinal (ej., absceso cerebral, tromboflebitis supurativa o aneurisma micótica). Debe ser cultivado para anaerobios, particularmente para *Cutibacterium acnes*, en pacientes con infecciones de derivación del sistema nervioso central (3).
- o La meningitis crónica debida a infección por levaduras u hongos en el sistema nervioso central es poco común, y las solicitudes de pruebas especializadas deben restringirse a pacientes con exposición a patógenos fúngicos sistémicos (*C. immitis*, *H. capsulatum* o *Blastomyces dermatitidis*) y aquellos inmunocomprometidos. La meningitis criptocócica es una infección oportunista que sugiere que un paciente infectado por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana está en fase SIDA. Los laboratorios de microbiología deben ser capaces de detectar la presencia de *Cryptococcus* en el LCR, y en este caso se debe realizar una prueba de antígeno criptocócico de forma rutinaria en muestras de LCR recolectadas de pacientes inmunocomprometidos (3).
- o Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 59 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota de piel y mucosas.
- Es conveniente custodiar cualquier remanente de la muestra posterior a su procesamiento en refrigeración. Esta puede ser necesaria para realizar verificaciones o estudios posteriores.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 5.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de LCR		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz	Sistema automatizado para ID Y PSA Analizador automatizado de hemocultivos	Sistema MALDI-TOF³ Incubadora bacteriológica de CO₂ a 37°C³
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Medio líquido de enriquecimiento¹ Agares cromogénicos para detección de resistencias³	Botellas hemocultivo adulto aerobios y anaerobios² Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Aguja doble o jeringa	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción Gram Técnicas moleculares³ Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis³ Medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias³

1. Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC)**, **Tioglicolato (TIO)** o **Caldo Trypticase Soya (CTS)**.
2. Deben contener resinas, para contrarrestar altas cargas de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos. El cultivo en frascos de hemocultivo es complementario al cultivo en medios sólidos
3. Según disponibilidad del centro

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

Cuadro 5.2 Cantidad de muestras recolectadas según análisis solicitados para estudio de LCR (3).

Distribución de muestra de LCR para análisis en Laboratorio Clínico		
Tubo de recolección	Pruebas de Laboratorio	Consideraciones especiales
1.Química Clínica	Proteínas totales y fraccionadas Índice de globulinas Glucosa	Si se recibe un solo tubo de LCR, la muestra indicada es el sobrenadante posterior al montaje de examen directo y cultivo
2.Microbiología	Tinción Gram y Cultivo por bacterias Detección de Antígenos de <i>Cryptococcus</i> spp.	La cantidad mínima de muestra para estudios de bacterias habituales en adultos y niños es de 1 mL y en neonatos es de 0,5 mL. La cantidad mínima requerida para cultivos por hongos es de 3 mL. Se requiere 3 muestras (seriado) para descartar definitivamente etiología fúngica en meningitis crónica.
3.Hematología	Recuento celular con diferencial leucocitario	Se puede utilizar utilizar analizadores automatizados validados para recuento de líquidos de punción.
4.Microbiología (Tuberculosis)*	Tinción Ziehl- Neelsen Auramina Rodamina Cultivo por micobacterias	La cantidad mínima requerida para cultivo por micobacterias es 5 mL. Se requiere 3 muestras (seriado) para descartar definitivamente etiología de tuberculosis en meningitis crónica.
5.Patógenos especiales*	PCR por virus Amebas de vida libre Cultivo anaerobios	Diagnóstico viral se justifica solo en casos de proteinorraquia y leucorraquia.

Los tubos 4 y 5 se recolectarán dependiendo de los estudios solicitados

1. Registre las características físicas del LCR previo a su manipulación: volumen, aspecto (ejemplo: cristalino, hemorrágico, turbio, xantocrómico) y presencia de coágulo o película.

NOTA: El proceso de cultivo en medios sólidos, líquidos y tinción de Gram, depende del volumen de muestra disponible. En la tabla 5.3 se detalla las variaciones de proceso de acuerdo al volumen de líquido recibido.

2. Inocule un frasco de hemocultivo si se cuenta con este insumo y el volumen suficiente de muestra (tabla 5.3). Tome en cuenta que los frascos de hemocultivos utilizados para cultivar líquidos de origen estéril pueden llegar a requerir la adición de sangre, por ejemplo, de sangre equina desfibrinada estéril (10,0% (v/v), que

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 61 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

favorece el crecimiento, especialmente para la recuperación de microorganismos exigentes como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*.

3. Centrifugue el LCR (1000-1500 x g/10 minutos) en centrífuga convencional. Si se dispone de citocentrífuga, una porción puede separarse y realizar la lámina para tinción de Gram. Para volúmenes menores a 1mL de muestra no se recomienda la centrifugación.
4. Registre la coloración post-centrifugación del LCR.
5. Transfiera el sobrenadante a un tubo. Si sólo se recibió 1 tubo, esta porción debe trasladarse a los respectivos departamentos para que se realicen las pruebas bioquímicas, moleculares y serológicas, según solicitud.
6. Resuspenda el sedimento e inocule mediante técnica por goteo el COS y ACH y agregue muestra al medio líquido (considere que este caldo sólo se utiliza si no se logra inocular en el frasco de hemocultivo). Además, con el sedimento, realice el frotis para tinción de Gram y otros procedimientos adicionales como tinta china o la detección de antígeno por *Cryptococcus*.
7. Prepare el frotis para la tinción Gram a partir del líquido centrifugado colocando 1-2 gotas en un portaobjetos. No se debe extender el frotis a menos que el material sea purulento y/o grueso. Si cuenta con citocentrífuga, utilice la muestra sin centrifugar que había separado previamente y siga las instrucciones específicas del fabricante para la operación de esta. Fije las láminas preparadas con metanol y proceda a realizar la tinción.
8. Incube las placas en capnofilia a 35-37°C. En caso de contar con el medio líquido de enriquecimiento, colóquelo en gradilla en posición vertical en aerobiosis a 35-37°C.
9. Si está realizando estudio por anaerobios, incube las placas y el caldo de tioglicolato en la incubadora de anaerobiosis. Si no cuenta con cámara de anaerobiosis, utilice técnicas para generar el ambiente e incube. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de incubación y procesamiento de cultivo anaerobio.

Cuadro 5.3 Variaciones en el cultivo aeróbico del LCR dependiendo del volumen de muestra recibido (3).

Volumen	Indicación
< 0, 5 mL	1. Inocule sin diluir el agar ACH y realice un frotis para tinción de Gram 2. Agregue 0,5 mL del medio líquido a la muestra y homogenice con vórtex, de forma que el medio líquido entre en contacto con las paredes del tubo 3. Use este volumen expandido (muestra diluida) e inocule el COS y el medio líquido. Además, prepare un segundo extendido para Gram Nota: En el reporte indique el volumen recibido y la cantidad de caldo agregado.

> 0,5 mL y < 1 mL	1. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH) 2. Realice frotis para tinción de Gram 3. Agregue la muestra restante al medio líquido
> 1ml	1. Debe inocularse en una botella de hemocultivo con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido. Debe utilizar el tipo de botella avalada por el fabricante para el cultivo de líquidos de punción. 2. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH). 3. Prepare el frotis para tinción de Gram
Muestra coagulada	1. Coloque el coágulo en un homogeneizador de muestras. 2. Añada al homogeneizador 1 mL de solución salina estéril o medio líquido y con suavidad disperse el coágulo para liberar las bacterias atrapadas 3. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH) 4. Inocule el medio líquido de enriquecimiento con el material restante.
Solicitud de cultivo por anaerobios	1. Inocule las placas con 2 o 3 gotas de muestra en los medios sólidos 2. Inocule el medio líquido o la botella de hemocultivo (avalada para la recuperación de bacterias anaerobias). Debe inocularse con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido.

Análisis e interpretación de cultivos

Estudio por bacterias aerobias:

1. Examine todas las placas en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube. Lea diariamente durante 4 días más, para un total de 5 días de incubación.
2. Examine el medio líquido en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas.
 - a. Realice tinción de Gram al caldo ante evidencia de crecimiento y repique en los medios de cultivo correspondientes, según sospecha microbiológica.
 - b. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube y lea diariamente durante 4 días más en busca de evidencia de crecimiento, para un total de 5 días de incubación.
3. Proceda a la valoración de cada crecimiento obtenido en los diferentes medios de cultivo y aislamientos de los caldos de enriquecimiento. En cuanto al crecimiento a partir de botellas de hemocultivo, valore y compare con respecto al primocultivo. Realice ID y PSA a los aislamientos con significancia clínica de acuerdo a los estándares vigentes de CLSI. Si el aislamiento es un claro contaminante, proceda únicamente con la ID por el equipo automatizado. Todos los detalles de jerarquización de cultivos de LCR se describen en el cuadro 5.4 (5).

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 63 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Estudio por bacterias anaerobias

1. Examine a las 48 horas los medios de cultivo para detectar todas las colonias morfológicamente diferentes. Proceda a realizar los re aislamientos necesarios para obtener cultivo puro de cada morfotipo colonial. En caso de no observar crecimiento, reincube hasta por 7 días.
2. A cada colonia se le realiza una prueba de aerotolerancia para diferenciar los aerobios y facultativos de los anaerobios. A los aerobios y facultativos que no se hayan detectado en los medios incubados en CO₂ y que se consideren clínicamente significativos, se les realiza identificación.
3. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de análisis e interpretación del cultivo anaerobio.

Frascos de hemocultivos

1. Incube los frascos de hemocultivo durante 5 días. Si se detecta crecimiento en la botella, se sigue el mismo procedimiento utilizado para muestras de sangre, indicado en el módulo de hemocultivos.

Cuadro 5.4 Principales microorganismos aislados de LCR y su interpretación.

Microorganismo	Interpretación
<i>Neisseria meningitidis</i> – <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i> – <i>Cryptococcus gattii</i> <i>Coccidioides spp</i> – <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i>	Estos microorganismos nunca son contaminantes en LCR. Realice ID y PSA
<i>Staphylococcus aureus</i> - Bacilos Gram negativo Estreptococos beta hemolíticos - <i>Candida spp.</i>	Infrecuentemente son contaminantes. Realice ID y PSA
<u>Pacientes sin traumatismo abierto ni mielomeningocele:</u> Crecimiento en medio sólido de microorganismos de piel como: - SOSA – Difteroides – Micrococos - <i>Bacillus spp</i> – <i>Cutibacterium acnes</i>	Alta probabilidad de contaminación. Evalúe contexto clínico del paciente y las características bioquímicas y citológicas del LCR.
<u>Pacientes con traumatismo de cráneo o columna abierto o mielomeningocele</u> Crecimiento en medio sólido de microorganismos de piel como: - SOSA – Difteroides – Micrococos - <i>Bacillus spp</i> – <i>Cutibacterium acnes</i>	Realice ID y PSA en casos seleccionados según la comunicación con el médico tratante. Debe haber una indicación clara sobre la necesidad.



Aislamiento combinado de algunos de los siguientes: <i>Streptococcus pneumoniae</i> – <i>Neisseria meningitidis</i> – <i>Haemophilus influenzae</i> – <i>Streptococcus agalactiae</i> – <i>Listeria monocytogenes</i>	Informe ambos microorganismos. Realice ID y PSA
<u>En pacientes sin traumatismo abierto ni mielomeningocele.</u> Aislamiento de algunos de los siguientes: <i>Streptococcus pneumoniae</i> – <i>Neisseria meningitidis</i> – <i>Haemophilus influenzae</i> – <i>Streptococcus agalactiae</i> – <i>Listeria monocytogenes</i> & Crecimiento en medio sólido de microorganismos de piel como: - SOSA – Difteroides – Micrococos - <i>Bacillus</i> spp – <i>Cutibacterium acnes</i>	Informe cualquiera de los gérmenes del primer grupo (Realice ID y PSA), considere contaminante a los del segundo grupo (Realice solo ID)
<u>Pacientes con fístulas adquiridas o congénitas, procedimientos neuroquirúrgicos, pacientes inmunocomprometidos, presencia de absceso cerebral (<i>S.milleri</i>) o endocarditis: con citoquímico y clínica compatible, en ausencia de patógenos definidos.</u> Crecimiento en medio sólido de los microorganismos: Estreptococos del grupo viridans - <i>Neisseria</i> spp - <i>Haemophilus</i> spp	Realice ID y PSA
Crecimiento en medio sólido o líquido de: -<i>Enterococcus</i> spp.	Evalúe presencia de neurocirugía, traumatismo abierto de cráneo, mielomeningocele, inmunocomprometidos, endocarditis, neonatos. En ausencia de los mismos y con citoquímico y citología normal, sugiere alta probabilidad de contaminación.
Crecimiento en medio sólido o líquido de: -<i>Nocardia</i> spp.	Evalúe presencia de factores predisponentes como: tratamiento con agentes inmunosupresores, tumores malignos, traumatismo de cráneo, enfermedad granulomatosa crónica, sarcoidosis, transplantados, procedimientos en el SNC. El 75% de los pacientes con meningitis por este agente presenta alguno de los factores mencionados.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 65 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Crecimiento en medio sólido o líquido de: <i>Candida albida</i> - <i>Candida laurentii</i>	Son infrecuentes y para jerarquizar el cultivo, se debe contar con histopatología.
Crecimiento solo en medio líquido de microorganismos de piel como: - SOSA – Difteroides – Micrococos - <i>Bacillus</i> spp – <i>Cutibacterium acnes</i>	Alta probabilidad de contaminación. Analice los resultados de celularidad, tinción de Gram y bioquímica del LCR, junto al contexto clínico del paciente (comunicación con el médico) para definir si el aislamiento tiene significancia clínica

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

1. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en aerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
2. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
3. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en aerobiosis y anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios y anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
4. Si se observa la presencia de un posible contaminante de acuerdo con los criterios establecidos, reporte:
 - a. **[Identificación del microorganismo]. “Microorganismo se considera generalmente contaminante, valorar bajo contexto clínico del paciente”**.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 66 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Reporte de resultados positivos

1. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en LCR, reporte:

a. ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

REFERENCIAS

1. Codina, M.G., de Cueto, M., Echeverría, J.E., Vicente D. (2010). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central: Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Cap. 36.
2. Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
3. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical microbiology procedures Handbook. AMS Press. <https://doi.org/10.1128/97815558188146>.
4. Ropper, A.H., Samuels, M.A, Kelon, J.P. eds. Adams y Victor. (2016). Infecciones del sistema nervioso (por bacterias, hongos, espiroquetas, parásitos) y sarcoidosis. Principios de neurología, 10e. McGrawHill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1908§ionid=141327997>
5. Soloaga, R. Guelfand, L.(2013). Curso de Microbiología: Meningitis y otras infecciones del Sistema Nervioso Centra. Argentina: <https://cababc.org.ar/diagnostico-microbiologico/>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 67 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 6: Diagnóstico microbiológico de infecciones intraabdominales: Análisis de líquido peritoneal

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Las infecciones intraabdominales (IIA) son muy frecuentes, se producen casi siempre por perforación o inflamación de la pared intestinal y especialmente a partir de la microbiota gastrointestinal. Específicamente, la peritonitis es una inflamación de la cavidad peritoneal debida a una infección, traumatismos o irritantes químicos como la bilis, el jugo pancreático o los jugos intestinales. En general, se presenta de forma aguda y puede ser localizada o difusa. Las peritonitis infecciosas, dependiendo de su origen, suelen clasificarse como primarias, secundarias y terciarias (1).

La peritonitis primaria o espontánea no está relacionada con ningún foco intraabdominal o perforación del tubo digestivo. La secundaria suele aparecer tras una complicación intraabdominal como una perforación gástrica o de víscera hueca, ruptura del apéndice o de un absceso o contaminación quirúrgica o traumática. La peritonitis terciaria aparece en pacientes postoperados con una peritonitis secundaria que no responde al tratamiento y que presenta fallo multiorgánico o sepsis (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de toma de muestra, sitio de recolección, técnica de obtención de la muestra
Muestras clínicas indicadas	
-Líquido peritoneal: obtenido por aspiración percutánea (paracentesis), procedimientos quirúrgicos (cirugía abierta) o endoscópicos realizado por personal médico	-Líquido de efluente (diálisis peritoneal): Obtenido por punción con aguja y jeringa de la zona diseñada para la administración de fármacos de la bolsa de diálisis más turbia (1).
Criterios de rechazo	
-Las muestras de fluidos corporales se recolectan con riesgo y costo para el paciente, con la expectativa de tomar decisiones médicas después de su análisis. Como regla general, las muestras de fluidos biológicos no deben rechazarse ni desecharse sin una discusión exhaustiva con el médico que las solicitó (3).	-Rechace muestras en tubos con anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato, ya que tienen más probabilidad de inhibir los microorganismos en las muestras de fluidos (3).
-Especímenes enviados en jeringa.	-Recipiente no estéril.
Recipiente indicado para la recolección	
-Tubo estéril con tapa de rosca	- Tubo estéril al vacío para extracción de sangre sin aditivos

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 68 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

-Frasco estéril de boca ancha	-<u>Estudio por anaerobios:</u> Idealmente, tubos con medio de transporte para anaerobios pre reducidos. Si bien el caldo Chopped Meat no un medio de transporte, se puede emplear para este fin. Como alternativa: Tubo al vacío sin aditivos ni anticoagulantes.
Condiciones de transporte	
-El transporte de muestras de líquido peritoneal al Laboratorio Clínico debe ser inmediato (≤ 15 min) a temperatura ambiente. -No se debe refrigerar la muestra ya que afecta la recuperación de bacterias (2,3). -Las muestras deben procesarse de forma inmediata (3).	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de líquido peritoneal

- La microbiota del tubo digestivo interviene en infecciones oportunistas o endógenas en circunstancias tales como obstrucciones mecánicas, o perforación del tubo digestivo. En este caso, los microorganismos presentes pasan a la cavidad peritoneal, siendo los agentes etiológicos habituales de las infecciones intraabdominales (1).
- Se recomienda el uso del frascos de hemocultivo como medio líquido de enriquecimiento al ser más sensible en la recuperación. El uso de caldos como TIO ó BHI de manejo manual, se asocian a mayor posibilidad de contaminación en el proceso interno del laboratorio (1).
- En diversas muestras, el volumen impacta directamente en la sensibilidad del cultivo. Uno de los ejemplos más importantes es cuando se utilizan los frascos de hemocultivos. El volumen mínimo de líquido ascítico inoculado en los frascos, en pacientes con peritonitis primaria y para el cultivo del efluente de diálisis en pacientes con peritonitis asociada a la diálisis peritoneal, debe ser de 10 mL (5).
- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.
- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal.
- Es conveniente custodiar cualquier remanente de la muestra posterior a su procesamiento en refrigeración. Esta puede ser necesaria para realizar verificaciones o estudios posteriores.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 6.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de líquido peritoneal		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz Centrífuga de mesa	Sistema automatizado para ID Y PSA Analizador automatizado de hemocultivos	Sistema MALDI-TOF ³ Incubadora bacteriológica de CO ₂ a 37°C ³
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar MacConkey (MCK) Medio líquido de enriquecimiento¹ Agares cromogénicos para detección de resistencias³	Botellas hemocultivo adulto aerobios y anaerobios ² Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Aguja doble o jeringa	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción Gram Técnicas moleculares ³ Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis ³ Medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias ³

- Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC)**, **Tioglicolato (TIO)** o **Caldo Trypticase Soya (CTS)**.
- Deben contener resinas, para contrarrestar altas cargas de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos. El cultivo en frascos de hemocultivo es complementario al cultivo en medios sólidos
- Según disponibilidad del centro

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

- Registre las características físicas del líquido peritoneal previo a su manipulación: volumen, color y aspecto.

NOTA: El proceso de cultivo en medios sólidos, líquidos y tinción de Gram, depende del volumen de muestra disponible. En la tabla 6.2 se detalla las variaciones de proceso de acuerdo al volumen de líquido recibido.

- Inocule un frasco de hemocultivo si se cuenta con este insumo y el volumen suficiente de muestra (tabla 6.2). Tome en cuenta que los frascos de hemocultivos utilizados para cultivar líquidos de origen estéril pueden llegar a requerir la adición

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 70 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

de sangre, por ejemplo, de sangre equina desfibrinada estéril (10,0% (v/v), que favorece el crecimiento, especialmente para la recuperación de microorganismos exigentes como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*. **Contemple que el volumen mínimo que se requiere para inocular en el frasco de una muestra que proviene de diálisis peritoneal es de 10 mL.**

3. Si el aspecto del líquido es purulento, cargue un asa estéril y raye la muestra por dispersión/agotamiento en cuatro zonas en los siguientes medios: COS y MCK.
4. De lo contrario, continúe con los siguientes pasos: Centrifugue el líquido (1000-1500 x g/10 minutos) en centrífuga convencional. Si se dispone de citocentrífuga, una porción puede separarse y realizar la lámina para tinción de Gram. Para volúmenes menores a 1mL de muestra no se recomienda la centrifugación.
5. Transfiera el sobrenadante a un tubo. Si sólo se recibió 1 tubo, esta porción debe trasladarse a los respectivos departamentos para realizar las pruebas bioquímicas según solicitud.
6. Resuspenda el sedimento e inocule mediante técnica por goteo el COS, MCK y agregue muestra al medio líquido (considere que este caldo sólo se utiliza si no se logra inocular en el frasco de hemocultivo). Realice el frotis para la tinción de Gram con el sedimento.

NOTA: La inclusión del ACH se debe limitar al abordaje de peritonitis de origen vaginal o la observación de diplococos gram negativo en la tinción Gram. Se requiere para la recuperación de *Neisseria gonorrhoeae*.

7. Prepare el frotis para la tinción Gram a partir del líquido centrifugado colocando 1-2 gotas en un portaobjetos. No se debe extender el frotis a menos que el material sea purulento y/o grueso. Si cuenta con citocentrífuga, utilice la muestra sin centrifugar que había separado previamente y siga las instrucciones específicas del fabricante para la operación de esta. Fije las láminas preparadas con metanol y proceda a realizar la tinción.
8. Incube el COS en capnofilia a 35-37°C. Incube el medio líquido y placa de MCK en aerobiosis a 35-37°C.
9. Si está realizando estudio por anaerobios, incube las placas y el caldo de tioglicolato en la incubadora de anaerobiosis. Si no cuenta con cámara de anaerobiosis, utilice técnicas para generar el ambiente e incube. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de incubación y procesamiento de cultivo anaerobio.

Cuadro 6.2: Variaciones en el cultivo aeróbico del líquido peritoneal dependiendo del volumen de muestra recibido (3)

Volumen	Indicación
< 0,5 mL	1. Inocule sin diluir el COS y realice un frotis para tinción de Gram 2. Agregue 0,5 mL del medio líquido a la muestra y homogenice con vórtex, de forma que el medio líquido entre en contacto con las paredes del tubo 3. Use este volumen expandido (muestra diluida) e inocule el MCK y el medio líquido. Además, prepare un segundo extendido para Gram Nota: En el reporte indique el volumen recibido y la cantidad de caldo agregado.
> 0,5 mL y < 1 mL	1. Inocule todos los medios de cultivo (COS, MCK) 2. Realice frotis para tinción de Gram 3. Agregue la muestra restante al medio líquido
> 1 mL	1. Debe inocularse en una botella de hemocultivo con 1-10 mL del líquido (Debe ser 10 mL si corresponde a diálisis peritoneal). Considere utilizar el tipo de botella avalada por el fabricante para el cultivo de líquidos de punción, así como el volumen del suplemento requerido. No se recomienda la siembra de botella en peritonitis secundarias, dado su naturaleza polimicrobiana. 2. Inocule todos los medios de cultivo (COS, MCK) 3. Prepare el frotis para tinción de Gram
Solicitud de cultivo por anaerobios	1. Inocule las placas con 2 o 3 gotas de muestra en los medios sólidos 2. Inocule el medio líquido o la botella de hemocultivo (avalada para la recuperación de bacterias anaerobias). Debe inocularse con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido. Nota: Los cultivos de anaerobios en líquido peritoneal no son necesarios en peritonitis secundarias.

Análisis e interpretación de cultivos

Estudio por microorganismos aerobios

1. Examine todas las placas en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube. Lea diariamente durante 4 días más, para un total de 5 días de incubación.
2. Examine el medio líquido en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas.
 - a. Realice tinción de Gram al caldo ante evidencia de crecimiento y repique en los medios de cultivo correspondientes, según sospecha microbiológica.
 - b. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube y lea diariamente durante 4 días más en busca de evidencia de crecimiento, para un total de 5 días de incubación.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 72 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Estudio por bacterias anaerobias

1. Examine a las 48 horas los medios de cultivo para detectar todas las colonias morfológicamente diferentes. Proceda a realizar los re aislamientos necesarios para obtener cultivo puro de cada morfotipo colonial.
2. A cada colonia se le realiza una prueba de aerotolerancia para diferenciar los aerobios y facultativos de los anaerobios. A los aerobios y facultativos que no se hayan detectado en los medios incubados en CO₂ y que se consideren clínicamente significativos, se les realiza identificación.
3. La identificación de los microorganismos anaerobios se debe ajustar a las necesidades clínicas, características microbiológicas de la muestra y posibilidades técnicas del laboratorio. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de análisis e interpretación del cultivo anaerobio.

Frascos de hemocultivos

1. Incube los frascos de hemocultivo durante 5 días. Si se detecta crecimiento en la botella, se sigue el mismo procedimiento utilizado para muestras de sangre, indicado en el módulo de hemocultivos.

Proceda a la valoración de cada crecimiento obtenido en los diferentes medios de cultivo y aislamientos de los caldos de enriquecimiento. En cuanto al crecimiento a partir de botellas de hemocultivo, valore y compare con respecto al primocultivo. Realice ID y PSA a los aislamientos con significancia clínica de acuerdo a los estándares vigentes de CLSI. Si el aislamiento es un claro contaminante, proceda únicamente con la ID por el equipo automatizado. Todos los detalles de jerarquización de cultivos de líquido peritoneal se describen en el cuadro 6.3 (1,4).

Cuadro 6.3 Jerarquización de los microorganismos aislados de líquido peritoneal.

Cuadro clínico	Comentarios	Microorganismos aislados frecuentemente	Microorganismos aislados infrecuentemente
Peritonitis primaria en adulto	Principal grupo de riesgo: pacientes con cirrosis hepática Suelen ser monomicrobianas	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Enterococos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Estreptococos del grupo viridans
Peritonitis primaria: Peritonitis bacteriana espontánea de origen nosocomial	Suelen ser monomicrobianas	<i>Enterococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp Bacilos gramnegativos no entéricos (<i>Pseudomonas</i> spp.)	



Peritonitis primaria en infancia	Suelen ser monomicrobianas	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Peritonitis primaria asociada a diálisis peritoneal	La infección se produce habitualmente a partir de la piel por inoculación, migración a través del catéter o colonización de este por bacterias productoras de biopelículas. Suele ser monomicrobiana	SOSA <i>Staphylococcus aureus</i>	Estreptococos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterococos Enterobacterias (<i>E. coli</i>) <i>Candida</i> spp. Corinebacterias
Peritonitis secundaria Postperforación Postoperación Postraumática	Son polimicrobianas y mixtas. Se puede llegar a aislar por muestra de 5-10 especies.	Flora mixta aerobia: <i>E. coli</i> , estreptococos del grupo viridans, otras enterobacterias Anaerobios: <i>Bacteroides</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. (predominan cuando existe perforación del colon)	Enterobacterias resistentes <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (en pacientes con estancia hospitalaria previa y administración previa de antimicrobianos) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida</i> spp.
Peritonitis terciaria	Desde cultivos negativos a aislar patógenos de escaso poder patógeno y/o patógenos nosocomiales	SOSA Enterococos Estreptococos <i>Candida</i> spp.	Enterobacterias multirresistentes <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>
Casos poco frecuentes: Peritonitis de origen vaginal	Se puede dar en portadoras de DIU, puede ser consecuencia del ascenso de microorganismos a través de las trompas de Falopio.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 74 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

1. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
2. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
3. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquido incubados en aerobiosis y anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios y anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
4. Crecimiento polimicrobiano (que excede el máximo de morfotipos definido por centro), reporte:
 - a. **“Crecimiento polimicrobiano de múltiples morfotipos, lo cual limita la interpretación. El hallazgo sugiere posible fuga intestinal. Se recomienda indicar terapia antimicrobiana de acuerdo al contexto clínico del paciente”**.

Reporte de resultados positivos

5. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en líquido peritoneal, reporte:
 - a. **ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

REFERENCIAS

1. García García, I., García Garrote, F., García Sánchez J.E., Sánchez Romero, I. (2011) Diagnóstico microbiológico de las infecciones intraabdominales. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Cap 41.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 75 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

2. Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
3. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical microbiology procedures Handbook. AMS Press. <https://doi.org/10.1128/97815558188146>.
4. Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., III, Theel, E. S., Thomson, R. B., Jr, Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. In Clinical Infectious Diseases (Vol.67, Issue 6, pp. e1-e94). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
5. Soloaga, R. Guelfand, L.(2015). Curso de Microbiología: Los errores más frecuentes en el laboratorio de microbiología. Argentina: <https://cababc.org.ar/diagnostico-microbiologico/>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 76 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 7: Diagnóstico microbiológico de infecciones tracto respiratorio inferior: Análisis de líquido pleural

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

El líquido pleural se encuentra normalmente en el espacio entre el pulmón y la pared torácica, y su composición bioquímica es similar al plasma. Sin embargo, el líquido pleural se puede acumular excesivamente producto de diferentes patologías, resultando en un derrame pleural (3).

Un derrame paraneumónico simple o no complicado se define como flujo libre y fluido no infectado. Un derrame paraneumónico complicado se desarrolla cuando los microbios se translocan desde el parénquima pulmonar hasta infectar la pleura, y a menudo se define por mediciones bioquímicas, tales como niveles bajos de pH y glucosa en el líquido, elevación de la deshidrogenasa láctica, y acompañado por neutrofilia. Los derrames paraneumónicos complicados a menudo se caracterizan por adherencias o tabiques, dando resultado a colecciones líquidas. El empiema es conocido convencionalmente como presencia franca de pus en la cavidad pleural, pero en definiciones contemporáneas a veces se describen derrames no purulentos, donde se da la identificación bacteriana por medio de cultivo o tinción de Gram (6).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de toma de muestra, sitio de recolección, técnica de obtención de la muestra
Muestras clínicas indicadas(4).	
- Empiema pleural : Fluido con exudado purulento recolectado por el personal médico	- Líquido pleural : toracentesis, fluido recolectado por aspiración del espacio pleural seguido de punción de la pared torácica
Criterios de rechazo	
-Las muestras de fluidos corporales se recolectan con riesgo y costo para el paciente, con la expectativa de tomar decisiones médicas después de su análisis. Como regla general, las muestras de fluidos biológicos no deben rechazarse ni desecharse sin una discusión exhaustiva con el médico que las solicitó (3).	-Rechace muestras en tubos con anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato, ya que tienen más probabilidad de inhibir los microorganismos en las muestras de fluidos (3).
-Especímenes enviados en jeringa.	-Frasco no estéril
Recipiente indicado para la recolección	
-Tubo estéril con tapa de rosca	-Tubo estéril al vacío para extracción de sangre sin aditivos

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 77 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

-Frasco estéril de boca ancha	-<u>Estudio por anaerobios</u>: Idealmente, tubos con medio de transporte para anaerobios pre reducidos. Si bien el caldo Chopped Meat no un medio de transporte, se puede emplear para este fin. Como alternativa: Tubo al vacío sin aditivos ni anticoagulantes.
Condiciones de transporte	
-El transporte de muestras de líquido pleural al Laboratorio Clínico debe ser inmediato (≤ 15 min) a temperatura ambiente. -No se debe refrigerar la muestra ya que afecta la recuperación de bacterias (2,3). -Las muestras deben procesarse de forma inmediata (3).	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de líquido pleural

- La neumonía es el principal origen de la infección pleural. Los cocos Gram positivo son los microorganismos aislados con mayor frecuencia, seguido de los bacilos Gram negativo y anaerobios. Los llamados patógenos "atípicos" que comúnmente causan neumonía no tienen un papel significativo en la infección pleural (1).
- Se recomienda el uso del frascos de hemocultivo como medio líquido de enriquecimiento al ser más sensible en la recuperación. El uso de caldos como TIO ó BHI de manejo manual, se asocian a mayor posibilidad de contaminación en el proceso interno del laboratorio (4).
- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.
- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal (4).
- Es conveniente custodiar cualquier remanente de la muestra posterior a su procesamiento en refrigeración. Esta puede ser necesaria para realizar verificaciones o estudios posteriores.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 7.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de Líquido pleural		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C	Sistema automatizado para ID Y PSA Analizador automatizado de hemocultivos	Sistema MALDI-TOF³ Incubadora bacteriológica de CO₂ a 37°C³

Microscopio de luz		
Centrífuga de mesa		
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Agar MacConkey (MCK) Agar Manitol Sal (MSA) Medio líquido de enriquecimiento¹ Agares cromogénicos para detección de resistencias³	Botellas hemocultivo adulto aerobios y anaerobios ² Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Aguja doble o jeringa	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción Gram Técnicas moleculares ³ Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis ³ Medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias ³

1. Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC)**, **Tioglicolato (TIO)** o **Caldo Tripticasa Soya (CTS)**.
2. Deben contener resinas, para contrarrestar altas cargas de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos. El cultivo en frascos de hemocultivo es complementario al cultivo en medios sólidos.
3. Según disponibilidad del centro.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

1. Registre las características físicas del líquido pleural previo a su manipulación: volumen, color y aspecto.

NOTA: El proceso de cultivo en medios sólidos, líquidos y tinción de Gram, depende del volumen de muestra disponible. En la tabla 7.2 se detalla las variaciones de proceso de acuerdo al volumen de líquido recibido.

2. Inocule un frasco de hemocultivo si se cuenta con este insumo y el volumen suficiente de muestra (tabla 7.2). Tome en cuenta que los frascos de hemocultivos utilizados para cultivar líquidos de origen estéril pueden llegar a requerir la adición de sangre, por ejemplo, de sangre equina desfibrinada estéril (10,0% (v/v), que favorece el crecimiento, especialmente para la recuperación de microorganismos exigentes como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*.
3. Si el aspecto del líquido es purulento, característico de losempiemas, cargue un asa estéril y raye la muestra por dispersión/agotamiento en cuatro zonas en los siguientes medios: COS, ACH, MCK, MSA.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 79 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

4. De lo contrario, continúe con los siguientes pasos: Centrifugue el líquido (1000-1500 x g/10 minutos) en centrífuga convencional. Si se dispone de citocentrífuga, una porción puede separarse y realizar la lámina para tinción de Gram. Para volúmenes menores a 1mL de muestra no se recomienda la centrifugación.
5. Transfiera el sobrenadante a un tubo. Si sólo se recibió 1 tubo, esta porción debe trasladarse a los respectivos departamentos para realizar las pruebas bioquímicas según solicitud.
6. Resuspenda el sedimento e inocule mediante técnica por goteo el COS, ACH, MCK y MSA, y agregue muestra al medio líquido (considere que este caldo sólo se utiliza si no se logra inocular en el frasco de hemocultivo).
7. Prepare el frotis para la tinción Gram a partir del líquido centrifugado colocando 1-2 gotas en un portaobjetos. No se debe extender el frotis a menos que el material sea purulento y/o grueso. Si cuenta con citocentrífuga, utilice la muestra sin centrifugar que había separado previamente y siga las instrucciones específicas del fabricante para la operación de esta. Fije las láminas preparadas con metanol y proceda a realizar la tinción.
8. Incube el COS y ACH en capnofilia a 35-37°C. Incube el medio líquido, MCK y MSA en aerobiosis a 35-37°C.
9. Si está realizando estudio por anaerobios, incube las placas y el caldo de tioglicolato en la incubadora de anaerobiosis. Si no cuenta con cámara de anaerobiosis, utilice técnicas para generar el ambiente e incube. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de incubación y procesamiento de cultivo anaerobio.

Cuadro 7.2 Variaciones en el cultivo aeróbico del líquido pleural dependiendo del volumen de muestra recibido (4).

Volumen	Indicación
< 0, 5 mL	1. Inocule sin diluir el agar ACH y realice un frotis para tinción de Gram 2. Agregue 0,5 mL del medio líquido a la muestra y homogenice con vórtex, de forma que el medio líquido entre en contacto con las paredes del tubo 3. Use este volumen expandido (muestra diluida) e inocule el COS, MCK, MSA y el medio líquido. Además, prepare un segundo extendido para Gram Nota: En el reporte indique el volumen recibido y la cantidad de caldo agregado.
> 0,5 mL y < 1 mL	1. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, MCK, MSA) 2. Realice frotis para tinción de Gram 3. Agregue la muestra restante al medio líquido
> 1mL	1. Debe inocularse en una botella de hemocultivo con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido. Debe utilizar el tipo de botella avalada por el fabricante para el cultivo de líquidos de punción. 2. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, MCK, MSA).

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 80 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

	3. Prepare el frotis para tinción de Gram
Solicitud de cultivo por anaerobios	1. Inocule las placas con 2 o 3 gotas de muestra en los medios sólidos 2. Inocule el medio líquido o la botella de hemocultivo (avalada para la recuperación de bacterias anaerobias). Debe inocularse con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido.

Análisis e interpretación de cultivo

Estudio por aerobios:

1. Examine todas las placas en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube. Lea diariamente durante 4 días más, para un total de 5 días de incubación.
2. Examine el medio líquido en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas.
 - a. Realice tinción de Gram al caldo ante evidencia de crecimiento y repique en los medios de cultivo correspondientes, según sospecha microbiológica.
 - b. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube y lea diariamente durante 4 días más en busca de evidencia de crecimiento, para un total de 5 días de incubación.

Estudio por anaerobios

1. Examine a las 48 horas los medios de cultivo para detectar todas las colonias morfológicamente diferentes. Proceda a realizar los re aislamientos necesarios para obtener cultivo puro de cada morfotipo colonial. En caso de no observar crecimiento, reincube hasta por 7 días.
2. A cada colonia se le realiza una prueba de aerotolerancia para diferenciar los aerobios y facultativos de los anaerobios. A los aerobios y facultativos que no se hayan detectado en los medios incubados en CO₂ y que se consideren clínicamente significativos, se les realiza identificación.
3. La identificación de los microorganismos anaerobios se debe ajustar a las necesidades clínicas, características microbiológicas de la muestra y posibilidades técnicas del laboratorio. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de análisis e interpretación del cultivo anaerobio.

Frascos de hemocultivos

1. Incube los frascos de hemocultivo durante 5 días. Si se detecta crecimiento en la botella, se sigue el mismo procedimiento utilizado para muestras de sangre, indicado en el módulo de hemocultivos.

Proceda a la valoración de cada crecimiento obtenido en los diferentes medios de cultivo y aislamientos de los caldos de enriquecimiento. En cuanto al crecimiento a partir de botellas de hemocultivo, valore y compare con respecto al primocultivo. Realice ID y PSA a los aislamientos con significancia clínica de acuerdo a los estándares vigentes de CLSI. Si el aislamiento es un claro contaminante, proceda únicamente con la ID por el equipo automatizado. Todos los detalles de jerarquización de cultivos de líquido pleural se describen en el cuadro 7.3 (4,6).

Cuadro 7.3 Jerarquización de los microorganismos aislados de líquido pleural.

Cuadro clínico	Microorganismos aislados frecuentemente	Microorganismos aislados infrecuentemente
Infecciones pleurales adquiridas en la comunidad	Estreptococos del grupo viridans <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Enterobacterales <i>Pseudomonas</i> spp. Anaerobios¹	<u>Infecciones fúngicas:</u> <i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp <i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Pasteurella multocida</i> <i>Salmonella</i> no tifoidea <i>Nocardia</i> spp
Infecciones pleurales nosocomiales	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterobacterales (<i>Klebsiella</i> spp.) <i>Pseudomonas</i> spp. Estreptococos del grupo viridans <u>Anaerobios:</u> Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> - <i>Prevotella</i> spp - <i>Fusobacterium nucleatum</i> - <i>Peptostreptococcus</i> spp. - <i>Actinomyces</i> spp.	
Infecciones pleurales en niños	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (más frecuente) <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>	

-Crecimiento sólo en medio líquido de microorganismos como: SOSA Difteroides Micrococos <i>Bacillus</i> spp <i>Cutibacterium acnes</i>	Se recomienda analizar los resultados de celularidad, tinción de Gram y bioquímica del líquido, junto con el contexto clínico del paciente (comunicación con el médico) para definir si el aislamiento tiene significancia clínica y debe ser reportado	
---	--	--

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

- Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis, reporte:
 - “Cultivo negativo por microorganismos aerobios a los 5 días de incubación”**. Modificar los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
- Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en anaerobiosis, reporte:
 - “Cultivo negativo por microorganismos anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
- Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquido incubados en aerobiosis y anaerobiosis, reporte:
 - “Cultivo negativo por microorganismos aerobios y anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modificar los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
- Si se observa la presencia de un posible contaminante de acuerdo con los criterios establecidos, reporte:
 - [Identificación del microorganismo]. “Microorganismo se considera generalmente contaminante, valorar bajo contexto clínico del paciente”**.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 83 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Reporte de resultados positivos

5. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en líquido pleural, reporte:

a. ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

REFERENCIAS

1. Hassan M, Cargill T, Harriss E, *et al.* (2019). The microbiology of pleural infection in adults: a systematic review. *Eur Respir J.* 54:1900542. <https://doi.org/10.1183/13993003.00542-2019>.
2. Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
3. Kaplan JL, Porter RS (2011). Mediastinal and Pleural Disorders. In: *Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th ed.* Whitehouse Station, NJ. Merck Sharp & Dohme Corp. Chapter 204.
4. Leber, A. L. (Ed.). (2016). *Clinical microbiology procedures Handbook*. AMS Press. <https://doi.org/10.1128/97815558188146>.
5. Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. bS., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., III, Theel, E. S., Thomson, R. B., Jr, Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol.67, Issue 6, pp. e1-e94). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
6. Roy, Bapti., Shank, Hui Juin., Le. (2021). Pleural fluid investigations for pleural infections *Journal of Laboratory and Precision Medicine*, 1-13. <http://dx.doi.org/10.21037/jlpm-2021-01>.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 84 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 8: Diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas al parto: Análisis de líquido amniótico

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Las infecciones bacterianas intrauterinas se pueden presentar entre las membranas fetales, en la placenta, en el líquido amniótico, en el cordón umbilical o en el mismo feto. La infección de las membranas fetales documentada por hallazgos histopatológicos o el cultivo microbiológico, se denomina corioamnionitis (1).

Según los criterios diagnósticos y el modo de presentación, se distinguen tres tipos de corioamnionitis:

1. Corioamnionitis clínica: Es un cuadro infeccioso con repercusión analítica y afectación materna y fetal, que se define mediante criterios clínicos.
2. Corioamnionitis subclínica: Se presenta sin signos clínicos o síntomas de infección, pero con cultivo positivo en el líquido amniótico o datos analíticos de inflamación o de infección.
3. Corioamnionitis histopatológica: Se diagnostica de manera retrospectiva cuando existe evidencia microscópica de infiltración por leucocitos polimorfonucleares en las membranas fetales, el cordón umbilical o la placenta (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de toma de muestra, sitio de recolección, técnica de obtención de la muestra
Muestras clínicas indicadas (1).	
-Líquido amniótico: Se recolecta por amniocentesis transabdominal, aspiración con aguja en el momento de la cesárea o a través de un catéter transcervical intrauterino.	-El volumen mínimo requerido dependerá de los estudios que se desee realizar, pero se recomienda al menos un mínimo de 1 mL.
Criterios de rechazo	
-Las muestras de fluidos corporales se recolectan con riesgo y costo para el paciente, con la expectativa de tomar decisiones médicas después de su análisis. Como regla general, las muestras de fluidos biológicos no deben rechazarse ni	-Rechace muestras en tubos con anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato, ya que tienen más probabilidad de inhibir los microorganismos en las muestras de fluidos (3).

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 85 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

desecharse sin una discusión exhaustiva con el médico que las solicitó (3).	
-Especímenes enviados en jeringa.	-Fascos no estériles
Recipiente indicado para la recolección	
-Tubo estéril con tapa de rosca	- Tubo estéril al vacío para extracción de sangre sin aditivos
-Frasco estéril de boca ancha	- <u>Estudio por anaerobios</u> : Idealmente, tubos con medio de transporte para anaerobios pre reducidos. Si bien el caldo Chopped Meat no un medio de transporte, se puede emplear para este fin. Como alternativa: Tubo al vacío sin aditivos ni anticoagulantes.
Condiciones de transporte	
-El transporte de muestras de líquido amniótico al Laboratorio Clínico debe ser inmediato (≤ 15 min) a temperatura ambiente.	
-No se debe refrigerar la muestra ya que afecta la recuperación de bacterias (2,3).	
-Las muestras deben procesarse de forma inmediata (3).	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de líquido amniótico

- Las infecciones intraamnióticas se producen por una microbiota polimicrobiana con predominio de los microorganismos que se encuentran en la microbiota vaginal (especialmente en mujeres con vaginosis bacteriana) o de la microbiota del tracto digestivo. En los cultivos de estas infecciones, se puede aislar una media de 2 microorganismos diferentes por muestra (1).
- En el líquido amniótico se determina el recuento leucocitario, la concentración de glucosa y se realiza la tinción de Gram y el cultivo microbiológico. En condiciones normales no debe haber leucocitos en el líquido amniótico, y se considera un resultado alterado la presencia de más de 50 leucocitos/mm³. La concentración de glucosa de menos de 14 mg/dL tiene una sensibilidad para detectar un cultivo positivo en líquido amniótico del 87% y una especificidad del 91,7%. Si el punto de corte se baja a menos de 5 mg/dL, aumenta la correlación con el cultivo positivo a un 90%. El cultivo de líquido amniótico es la prueba más fiable y se considera el patrón de referencia para el diagnóstico de la corioamnionitis (1,4).
- Se recomienda el uso del frascos de hemocultivo como medio líquido de enriquecimiento al ser más sensible en la recuperación. El uso de caldos como TIO ó BHI de manejo manual, se asocian a mayor posibilidad de contaminación en el proceso interno del laboratorio (3).
- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 86 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal (3).
- Es conveniente custodiar cualquier remanente de la muestra posterior a su procesamiento en refrigeración. Esta puede ser necesaria para realizar verificaciones o estudios posteriores.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 8.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de líquido amniótico		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz Centrífuga de mesa	Sistema automatizado para ID Y PSA Analizador automatizado de hemocultivos	Sistema MALDI-TOF³ Incubadora bacteriológica de CO₂ a 37°C³
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Agar MacConkey (MCK) Medio líquido de enriquecimiento¹ Agares cromogénicos para detección de resistencias³	Botellas hemocultivo adulto aerobios y anaerobios² Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Aguja doble o jeringa	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción Gram Técnicas moleculares³ Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis³ Medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias³

1. Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC)**, **Tioglicolato (TIO)** o **Caldo Tripticasa Soya (CTS)**.
2. Deben contener resinas, para contrarrestar altas cargas de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos. El cultivo en frascos de hemocultivo es complementario al cultivo en medios sólidos.
3. Según disponibilidad del centro.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 87 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

1. Registre las características físicas del líquido amniótico previo a su manipulación: volumen, color y aspecto.

NOTA: El proceso de cultivo en medios sólidos, líquidos y tinción de Gram, depende del volumen de muestra disponible. En la tabla 8.2 se detalla las variaciones de proceso de acuerdo al volumen de líquido recibido.

2. Inocule un frasco de hemocultivo si se cuenta con este insumo y el volumen suficiente de muestra (tabla 8.2). Tome en cuenta que los frascos de hemocultivos utilizados para cultivar líquidos de origen estéril pueden llegar a requerir la adición de sangre, por ejemplo, de sangre equina desfibrinada estéril (10,0% (v/v), que favorece el crecimiento, especialmente para la recuperación de microorganismos exigentes como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*.
3. Centrifugue el líquido a 1200 x g/10 minutos en centrífuga convencional. Si se dispone de citocentrífuga, una porción puede separarse y realizar la lámina para tinción de Gram. Para volúmenes menores a 1mL de muestra no se recomienda la centrifugación.
4. Transfiera el sobrenadante a un tubo. Si sólo se recibió 1 tubo, esta porción debe trasladarse a los respectivos departamentos para realizar las pruebas bioquímicas según solicitud.
5. Resuspenda el sedimento e inocule mediante técnica por goteo el COS, ACH y MCK, y agregue muestra al medio líquido (considere que este caldo sólo se utiliza si no se logra inocular en el frasco de hemocultivo).
6. Prepare el frotis para la tinción Gram a partir del líquido centrifugado colocando 1-2 gotas en un portaobjetos. No se debe extender el frotis a menos que el material sea purulento y/o grueso. Si cuenta con citocentrífuga, utilice la muestra sin centrifugar que había separado previamente y siga las instrucciones específicas del fabricante para la operación de esta. Fije las láminas preparadas con metanol y proceda a realizar la tinción.
7. Incube el COS y ACH en capnofilia a 35-37°C. Incube el medio líquido y placa de MCK en aerobiosis a 35-37°C.
8. Si está realizando estudio por anaerobios, incube las placas y el caldo de tioglicolato en la incubadora de anaerobiosis. Si no cuenta con cámara de anaerobiosis, utilice técnicas para generar el ambiente e incube. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de incubación y procesamiento de cultivo anaerobio.

Cuadro 8.2 Variaciones en el cultivo aeróbico del líquido amniótico dependiendo del volumen de muestra recibido (3).

Volumen	Indicación
< 0,5 mL	1. Inocule sin diluir el agar ACH y realice un frotis para tinción de Gram 2. Agregue 0,5 mL del medio líquido a la muestra y homogenice con vórtex, de forma que el medio líquido entre en contacto con las paredes del tubo 3. Use este volumen expandido (muestra diluida) e inocule el COS, MCK y el medio líquido. Además, prepare un segundo extendido para Gram Nota: En el reporte indique el volumen recibido y la cantidad de caldo agregado.
> 0,5 mL y < 1 mL	1. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, MCK) 2. Realice frotis para tinción de Gram 3. Agregue la muestra restante al medio líquido
> 1ml	1. Debe inocularse en una botella de hemocultivo con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido. Debe utilizar el tipo de botella avalada por el fabricante para el cultivo de líquidos de punción. 2. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, MCK). 3. Prepare el frotis para tinción de Gram
Solicitud de cultivo por anaerobios	1. Inocule las placas con 2 o 3 gotas de muestra en los medios sólidos 2. Inocule el medio líquido o la botella de hemocultivo (avalada para la recuperación de bacterias anaerobias). Debe inocularse con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido.

Análisis e interpretación de cultivos

- En la interpretación de los resultados microbiológicos de la infección intrauterina, se debe valorar el potencial patógeno e invasivo de los microorganismos aislados, y su capacidad para inducir una respuesta inflamatoria sistémica, independientemente de que otros factores prenatales y postnatales, también puedan contribuir a esta reacción.
- Considere el carácter polimicrobiano de estas infecciones que favorece la sinergia entre los microorganismos presentes, lo que en muchos casos aumenta la respuesta inmune. Por ello, se deben identificar, valorar e informar todos los microorganismos aislados en estas muestras (1).

Estudio por aerobios

1. Examine todas las placas en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube. Lea diariamente durante 4 días más, para un total de 5 días de incubación.
2. Examine el medio líquido en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas.
 - a. Realice tinción de Gram al caldo ante evidencia de crecimiento y repique en los medios de cultivo correspondientes, según sospecha microbiológica.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 89 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- b.** Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube y lea diariamente durante 4 días más en busca de evidencia de crecimiento, para un total de 5 días de incubación.

Estudio por anaerobios

1. Examine a las 48 horas los medios de cultivo para detectar todas las colonias morfológicamente diferentes. Proceda a realizar los re aislamientos necesarios para obtener cultivo puro de cada morfotipo colonial. En caso de no observar crecimiento, reincube hasta por 7 días.
2. A cada colonia se le realiza una prueba de aerotolerancia para diferenciar los aerobios y facultativos de los anaerobios. A los aerobios y facultativos que no se hayan detectado en los medios incubados en CO₂ y que se consideren clínicamente significativos, se les realiza identificación.
3. La identificación de los microorganismos anaerobios se debe ajustar a las necesidades clínicas, características microbiológicas de la muestra y posibilidades técnicas del laboratorio. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de análisis e interpretación del cultivo anaerobio.

Frascos de hemocultivos

1. Incube los frascos de hemocultivo durante 5 días. Si se detecta crecimiento en la botella, se sigue el mismo procedimiento utilizado para muestras de sangre, indicado en el módulo de hemocultivos.

Proceda a la valoración de cada crecimiento obtenido en los diferentes medios de cultivo y aislamientos de los caldos de enriquecimiento. En cuanto al crecimiento a partir de botellas de hemocultivo, valore y compare con respecto al primocultivo. Realice ID y PSA a los aislamientos con significancia clínica de acuerdo a los estándares vigentes de CLSI. Si el aislamiento es un claro contaminante, proceda únicamente con la ID por el equipo automatizado. Todos los detalles de jerarquización de cultivos de líquido amniótico se describen en el cuadro 8.3 (1).

Cuadro 8.3. Jerarquización de los microorganismos aislados de líquido amniótico.

Microorganismos aislados frecuentemente	Microorganismos infrecuentes	Microorganismos que son posibles contaminantes
<u>Microorganismos virulentos e invasivos:</u> <i>Streptococcus agalactiae</i> - <i>Escherichia coli</i> (u otras enterobacterias) - <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Enterococcus</i> spp. <i>Campylobacter</i> spp	SOSA <i>Lactobacillus</i> La interpretación de su relevancia clínica dependerá del contexto clínico de la paciente y de otras pruebas analíticas (celularidad, bioquímica y tinción de Gram)

	<i>Actinomyces</i> spp. <i>Candida</i> spp.	
<u>Microorganismos asociados a la vaginosis bacteriana:</u> <i>Gardnerella vaginalis</i> - <i>Streptococcus</i> spp.		
<u>Anaerobios:</u> <i>Prevotella</i> spp. - <i>Bacteroides</i> spp. - <i>Fusobacterium</i> spp. - <i>Peptostreptococcus</i> spp. - <i>Clostridium</i> spp		

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

- Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis, reporte:
 - “Cultivo negativo por microorganismos aerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
- Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en anaerobiosis, reporte:
 - “Cultivo negativo por microorganismos anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
- Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquido incubados en aerobiosis y anaerobiosis, reporte:
 - “Cultivo negativo por microorganismos aerobios y anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 91 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

4. Si se observa la presencia de un posible contaminante de acuerdo con los criterios establecidos, reporte:

- a. **[Identificación del microorganismo]. “Microorganismo se considera generalmente contaminante, valorar bajo contexto clínico del paciente”.**

Reporte de resultados positivos

5. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en líquido amniótico, reporte:

- a. **ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

REFERENCIAS

1. Delgado, S., García- Garrote, F., Padilla, B., Rodríguez-Gómez, J.M., Romero, B. (2015). Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, cap 54.
2. Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
3. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical microbiology procedures Handbook. AMS Press. <https://doi.org/10.1128/97815558188146>.
4. Sampedro Martínez, A., Aliaga Martínez, L., Mazuelas Teatino, P., Rodríguez- Granger, J. (2011). Diagnóstico de infección congénita. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(Supl 5):15-20

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 92 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 9. Diagnóstico microbiológico de infecciones pericárdicas: Análisis de líquido pericárdico

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

El pericardio es un saco fibroso que rodea completamente al corazón, separándolo de los órganos y estructuras vecinas. El interés por las pericardiopatías viene exclusiva y fundamentalmente justificado por el severo compromiso hemodinámico de algunos cuadros pericárdicos (taconamiento cardíaco, heridas pericárdicas, etc.), y de forma más secundaria, por los problemas de diagnóstico diferencial que estas pericardiopatías plantean con otras afecciones habitualmente tratadas en nuestro medio (infarto agudo de miocardio, tromboembolismo pulmonar e insuficiencia cardíaca crónica (5).

Hace 40 años, la fiebre reumática y la pericarditis bacteriana fueron las etiologías más comunes. Con la introducción de las terapias antibióticas y nuevas vacunas, en especial contra *H. influenzae*, las causas bacterianas han disminuido considerablemente. Actualmente, la frecuencia de las causas de derrame pericárdico depende de la población y lugar geográfico en que se haya estudiado. Publicaciones recientes señalan que las causas más comunes son las neoplásicas y las idiopáticas (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de toma de muestra, sitio de recolección, técnica de obtención de la muestra
Muestras clínicas indicadas (2).	
-Líquido pericárdico: pericardiocentesis, con aspiración del líquido mediante una jeringa heparinizada y separación inmediata en diferentes tubos realizado por el personal médico.	-El volumen mínimo requerido dependerá de los estudios que se desee realizar, pero se recomienda al menos un mínimo de 1 mL.
Criterios de rechazo	
-Las muestras de fluidos corporales se recolectan con riesgo y costo para el paciente, con la expectativa de tomar decisiones médicas después de su análisis. Como regla general, las muestras de fluidos biológicos no deben rechazarse ni desecharse sin una discusión exhaustiva con el médico que las solicitó (4).	-Rechace muestras en tubos con anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato, ya que tienen más probabilidad de inhibir los microorganismos en las muestras de fluidos (3).
-Especímenes enviados en jeringa.	-Frascos no estériles
Recipiente indicado para la recolección	
-Tubo estéril con tapa de rosca	-Tubo estéril al vacío para extracción de sangre sin aditivos
-Frasco estéril de boca ancha	

Condiciones de transporte
-El transporte de muestras de líquido pericárdico al Laboratorio Clínico debe ser inmediato (≤ 15 min) a temperatura ambiente. -No se debe refrigerar la muestra ya que afecta la recuperación de bacterias (2,3). -Las muestras deben procesarse de forma inmediata (3).

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de líquido pericárdico

- El estudio de derrames pericárdicos es poco común en el laboratorio en comparación con los otros tipos de derrames. A menos que el líquido pericárdico se acumule en gran cantidad o produzca compromiso hemodinámico (es decir, taponamiento cardíaco), el líquido generalmente no se extrae para estudio. Por lo tanto, la recolección de datos para realizar análisis sistemático es difícil de lograr (2).
- Se recomienda el uso del frascos de hemocultivo como medio líquido de enriquecimiento al ser más sensible en la recuperación. El uso de caldos como TIO ó BHI de manejo manual, se asocian a mayor posibilidad de contaminación en el proceso interno del laboratorio (4).
- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.
- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal (4).
- Es conveniente custodiar cualquier remanente de la muestra posterior a su procesamiento en refrigeración. Esta puede ser necesaria para realizar verificaciones o estudios posteriores.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 9.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de líquido pericárdico		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ³
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz Centrífuga de mesa	Sistema automatizado para ID Y PSA Analizador automatizado de hemocultivos	Sistema MALDI-TOF Incubadora bacteriológica de CO2 a 37°C
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias



Agar Sangre (COS)	Botellas hemocultivo adulto aerobios y anaerobios ²	
Agar Chocolate (ACH)	Asas bacteriológicas	Oxidasa
Agar MacConkey (MCK)	Sistema generador de atmósfera de capnofilia	Catalasa
Agar Manitol Sal (MSA)	Portaobjetos	Coagulasa en lámina
Medio líquido de enriquecimiento¹	Alcohol de 70%	Reactivos para tinción Gram
Agares cromogénicos para detección de resistencias³	Aguja doble o jeringa	Técnicas moleculares ³

1. Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón** (ICC), **Tioglicolato** (TIO) o **Caldo Trypticase Soya** (CTS).
2. Deben contener resinas, para contrarrestar altas cargas de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos. El cultivo en frascos de hemocultivo es complementario al cultivo en medios sólidos
3. Según disponibilidad del centro

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

1. Registre las características físicas del líquido pericárdico previo a su manipulación: volumen, color y aspecto.

NOTA: El proceso de cultivo en medios sólidos, líquidos y tinción de Gram, depende del volumen de muestra disponible. En la tabla 9.2 se detalla las variaciones de proceso de acuerdo al volumen de líquido recibido.

2. Inocule un frasco de hemocultivo si se cuenta con este insumo y el volumen suficiente de muestra (tabla 9.2). Tome en cuenta que los frascos de hemocultivos utilizados para cultivar líquidos de origen estéril pueden llegar a requerir la adición de sangre, por ejemplo, de sangre equina desfibrinada estéril (10,0% (v/v), que favorece el crecimiento, especialmente para la recuperación de microorganismos exigentes como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*.
3. Centrifugue el líquido (1000-1500 x g/10 minutos) en centrífuga convencional. Si se dispone de citocentrífuga, una porción puede separarse y realizar la lámina para tinción de Gram. Para volúmenes menores a 1mL de muestra no se recomienda la centrifugación.
4. Transfiera el sobrenadante a un tubo. Si sólo se recibió 1 tubo, esta porción debe trasladarse a los respectivos departamentos para realizar las pruebas bioquímicas según solicitud.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 95 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

5. Resuspenda el sedimento e inocule mediante técnica por goteo el COS, ACH, MCK y MSA, agregue muestra al medio líquido (considere que este caldo sólo se utiliza si no se logra inocular en el frasco de hemocultivo).
6. Prepare el frotis para la tinción Gram a partir del líquido centrifugado colocando 1-2 gotas en un portaobjetos. No se debe extender el frotis a menos que el material sea purulento y/o grueso. Si cuenta con citocentrífuga, utilice la muestra sin centrifugar que había separado previamente y siga las instrucciones específicas del fabricante para la operación de esta. Fije las láminas preparadas con metanol y proceda a realizar la tinción.
7. Incube el COS y ACH en capnofilia a 35-37°C. Incube el medio líquido y placas de MCK y MSA en aerobiosis a 35-37°C.

Cuadro 9.2: Variaciones en el cultivo aeróbico del líquido pericárdico dependiendo del volumen de muestra recibido (4).

Volumen	Indicación
< 0, 5 mL	1. Inocule sin diluir el agar ACH y realice un frotis para tinción de Gram 2. Agregue 0,5 mL del medio líquido a la muestra y homogenice con vórtex, de forma que el medio líquido entre en contacto con las paredes del tubo 3. Use este volumen expandido (muestra diluida) e inocule el COS, MCK y el medio líquido. Además, prepare un segundo extendido para Gram Nota: En el reporte indique el volumen recibido y la cantidad de caldo agregado.
> 0,5 mL y < 1 mL	1. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, MCK, MSA) 2. Realice frotis para tinción de Gram 3. Agregue la muestra restante al medio líquido
> 1ml	1. Debe inocularse en una botella de hemocultivo con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido. Debe utilizar el tipo de botella avalada por el fabricante para el cultivo de líquidos de punción. 2. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, MCK, MSA). 3. Prepare el frotis para tinción de Gram
Solicitud de cultivo por anaerobios	No se indica para muestra de líquido pericárdico

Análisis e interpretación de cultivos

A menos que el líquido pericárdico se acumule en gran cantidad, o produzca compromiso hemodinámico, es decir, taponamiento cardíaco, se recolecta la muestra. De lo contrario, no se realiza su recolección por los riesgos que involucra este procedimiento. Por esta razón, la descripción de los principales agentes etiológicos es limitada (2).

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 96 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Estudio por aerobios

1. Examine todas las placas en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube. Lea diariamente durante 4 días más, para un total de 5 días de incubación.
2. Examine el medio líquido en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas.
 - a. Realice tinción de Gram al caldo ante evidencia de crecimiento y repique en los medios de cultivo correspondientes, según sospecha microbiológica.
 - b. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube y lea diariamente durante 4 días más en busca de evidencia de crecimiento, para un total de 5 días de incubación.

Frascos de hemocultivos

1. Incube los frascos de hemocultivo durante 5 días. Si se detecta crecimiento en la botella, se sigue el mismo procedimiento utilizado para muestras de sangre, indicado en el módulo de hemocultivos.

Proceda a la valoración de cada crecimiento obtenido en los diferentes medios de cultivo y aislamientos de los caldos de enriquecimiento. En cuanto al crecimiento a partir de botellas de hemocultivo, valore y compare con respecto al primocultivo. Realice ID y PSA a los aislamientos con significancia clínica de acuerdo a los estándares vigentes de CLSI. Si el aislamiento es un claro contaminante, proceda únicamente con la ID por el equipo automatizado. Todos los detalles de jerarquización de cultivos de líquido pericárdico se describen en el cuadro 9.3 (1,6).

Cuadro 9.3: Principales microorganismos aislados de líquido pericárdico.

Microorganismos descritos en la literatura como agentes causantes de pericarditis en niños y adultos
<i>Staphylococcus. aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> Enterobacterias

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 97 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

1. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios a los 5 días de incubación”**. Modificar los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
2. Si se observa la presencia de un posible contaminante de acuerdo con los criterios establecidos, reporte:
 - a. **[Identificación del microorganismo]. “Microorganismo se considera generalmente contaminante, valorar bajo contexto clínico del paciente”**.

Reporte de resultados positivos

3. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en líquido pericárdico, reporte:
 - a. **ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

REFERENCIAS

1. Clavería C., Vergara, L., Negrón, S., Lopez, C., Zelada, P., Carrasco, J.A. (2009). Derrame Pericárdico, Enfrentamiento Clínico. Rev Chil Pediatr 2009; 80 (3): 267-273.
2. Dragoescu, E.A., Liu, L. (2013). Pericardial fluid cytology: An analysis of 128 specimens over a 6-year period. Cancer Cytopathology: 121: 242-251. <https://doi.org/10.1002/cncy.21246>.
3. Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
4. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical microbiology procedures Handbook. AMS Press. <https://doi.org/10.1128/97815558188146>.
5. Merino, A., Marín, J.L. (2016). Citología y Bioquímica de los Líquidos Biológicos. Ed Cont Lab Clín; 28: 12-135.
6. Ruiz García, E., Ruiz García M.I., Vela Colmero, R.M., Ruiz García, R.A. (2017). Pericarditis Aguda. Med fam Andal Vol. 18 (2):56-65.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 98 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 10: Diagnóstico microbiológico de artritis: Análisis de líquido sinovial/articular

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

La artritis es la inflamación de las articulaciones y del tejido sinovial, cuya etiología puede ser infecciosa (1,2). La incidencia publicada de artritis séptica varía desde 2 a 6 cada 100.000 personas por año en una población general, pero puede alcanzar valores de hasta 70 por 100.000 personas por año entre pacientes con artritis reumatoidea y 40 a 68 cada 100.000 personas por año entre los individuos con una prótesis articular (3). Puede afectarse cualquier articulación, pero se suelen afectar más las grandes que las pequeñas articulaciones, siendo la rodilla la más frecuente (50%), seguida de la cadera (20%), hombro (8%), tobillo (7%) y la muñeca (7%). Las articulaciones de codo, interfalángica, esternoclavicular y sacroilíaca se afectan con menor frecuencia (1-4%) (4).

La artritis séptica bacteriana es la enfermedad que más rápidamente destruye las articulaciones y es por lo tanto una emergencia médica que requiere diagnóstico rápido y tratamiento precoz y agresivo. La pérdida de la función articular se da en 10-32% de los pacientes y la mortalidad asociada ronda el 5-15% (2).

Para evitar complicaciones y tratamientos innecesarios (incluida la cirugía) es preciso contar con métodos de diagnóstico rápido y certero que lleven a la optimización del tratamiento tan pronto como sea posible.

La infección articular gonocócica tiene dos presentaciones clínicas principales. La primera, se produce por diseminación del gonococo a partir de cuello uterino, uretra o faringe, cuya manifestaciones son inmediatas y consisten en afección poliarticular, fiebre y lesiones cutáneas (múltiples). Las articulaciones más afectadas son las ubicadas en manos, rodillas, muñeca, tobillos y codos (1-4,7).

La segunda presentación de artritis gonocócica es monoarticular, sin síntomas sistémicos, tenosinovitis, ni lesiones cutáneas. Se diferencia además de requerir incubación, manifestándose tiempo después de la diseminación gonocócica. Puede ir precedido de un síndrome de dermatitis-artritis (1-4,7).

El diagnóstico diferencial de la artritis séptica bacteriana incluye cuadros clínicos como la gota, pseudogota, artritis reactiva, artritis reumatoide (y sus reagudizaciones), artritis víricas y la enfermedad de Lyme (1).

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 99 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Muestras clínicas indicadas

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de toma de muestra, sitio de recolección, técnica de obtención de la muestra
Muestras clínicas indicadas (4-6).	
- <u>Líquido articular</u> : Ideal	- <u>Biopsias sinoviales</u> : (Para el procesamiento de esta muestra refiérase al módulo 12 de piel y tejidos blandos).
- <u>Exudados peri-implante</u> : en caso de implantes articulares	
Criterios de rechazo	
-Las muestras de fluidos corporales se recolectan con riesgo y costo para el paciente, con la expectativa de tomar decisiones médicas después de su análisis. Como regla general, las muestras de fluidos biológicos no deben rechazarse ni desecharse sin una discusión exhaustiva con el médico que las solicitó (4).	-Rechace muestras en tubos con anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato, ya que tienen más probabilidad de inhibir los microorganismos en las muestras de fluidos (3).
-Muestras de líquido articular y exudados peri-implante recogidas en torundas.	-Especímenes enviados en jeringa.
-Frascos no estériles.	
Observaciones	
-Las muestras se deben obtener en las mayores condiciones de asepsia posible, realizando una correcta desinfección de la piel y con la menor manipulación posible.	-En el caso de sospecha de infección por <i>N. gonorrhoeae</i> , las muestras se deben inocular inmediatamente en medios selectivos.
Recipiente indicado para la recolección	
-Tubo estéril con tapa de rosca	- Tubo estéril al vacío para extracción de sangre sin aditivos.
-Frasco estéril de boca ancha	- <u>Estudio por anaerobios</u> : Idealmente, tubos con medio de transporte para anaerobios pre reducidos. Si bien el caldo Chopped Meat no un medio de transporte, se puede emplear para este fin. Como alternativa: Tubo al vacío sin aditivos ni anticoagulantes.
Condiciones de transporte	
-El transporte de muestras de líquido articular/sinovial al Laboratorio Clínico debe ser inmediato (≤15 min) a temperatura ambiente.	
-No se debe refrigerar la muestra ya que afecta la recuperación de bacterias (2,3).	
-Las muestras deben procesarse de forma inmediata (3).	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de líquido articular

- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 100 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal (3).
- El cultivo articular es el estándar de oro o método diagnóstico definitivo de la artritis séptica, por lo que su recolección es de gran relevancia (2). En los pacientes con artritis séptica que no han iniciado terapia antimicrobiana, el cultivo articular resulta positivo en el 80-90% de los casos. En la infección gonocócica, los cultivos son positivos en sólo un 25% de los casos (4). Por su parte, la tinción de Gram en la artritis séptica tiene una sensibilidad baja que va aproximadamente de 25- 65 % (2), mientras que en la artritis gonocócica esta disminuye a < 10% (4) . Un resultado de cultivo negativo o la ausencia de bacterias en el Gram no excluye la posibilidad de una artritis séptica (4).
- Se recomienda el uso del frascos de hemocultivo como medio líquido de enriquecimiento al ser más sensible en la recuperación. El uso de caldos como TIO ó BHI de manejo manual, se asocian a mayor posibilidad de contaminación en el proceso interno del laboratorio (5).
- La artritis séptica es una situación clínica urgente. Si se observa la presencia de microorganismos en la tinción de Gram del líquido sinovial, el laboratorio debe notificar prontamente los resultados al personal médico.
- Es conveniente custodiar cualquier remanente de la muestra posterior a su procesamiento en refrigeración. Esta puede ser necesaria para realizar verificaciones o estudios posteriores.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 10.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de muestras de origen articular		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ³
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz Centrífuga de mesa	Sistema automatizado para ID Y PSA Analizador automatizado de hemocultivos	Sistema MALDI-TOF Incubadora bacteriológica de CO2 a 37°C
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Agar MacConkey	Botellas hemocultivo adulto aerobios y anaerobios ² Asas bacteriológicas	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción Gram

(MCK) Agar Manitol Sal (MSA) Agar Thayer Martin (ATM) Medio líquido de enriquecimiento¹ Agares cromogénicos para detección de resistencias³	Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Aguja doble o jeringa	Técnicas moleculares ³ Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis ³ Medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias ³
---	---	---

1. Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón** (ICC), **Tioglicolato** (TIO) o **Caldo Tripticasa Soya** (CTS).
2. Deben contener resinas, para contrarrestar altas cargas de antibióticos que inhiben el crecimiento de microorganismos. El cultivo en frascos de hemocultivo es complementario al cultivo en medios sólidos
3. Según disponibilidad del centro

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico (4-5)

1. Efectue el análisis macroscópico de la muestra que incluye: volumen total, viscosidad, color, aspecto, turbidez, presencia de coágulo, entre otros, antes de iniciar el análisis microbiológico.

NOTA: El proceso de cultivo en medios sólidos, líquidos y tinción de Gram, depende del volumen de muestra disponible. En la tabla 10.2 se detalla las variaciones de proceso de acuerdo al volumen de líquido recibido.

2. Inocule un frasco de hemocultivo si se cuenta con este insumo y el volumen suficiente de muestra (tabla 10.2). Tome en cuenta que los frascos de hemocultivos utilizados para cultivar líquidos de origen estéril pueden llegar a requerir la adición de sangre, por ejemplo, de sangre equina desfibrinada estéril (10,0% (v/v), que favorece el crecimiento, especialmente para la recuperación de microorganismos exigentes como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*.
3. Centrifugue el líquido (1000-1500 x g/10 minutos) en centrífuga convencional. Si se dispone de citocentrífuga, una porción puede separarse y realizar la lámina para tinción de Gram. Para volúmenes menores a 1mL de muestra no se recomienda la centrifugación.
4. Transfiera el sobrenadante a un tubo. Si sólo se recibió 1 tubo, esta porción debe trasladarse a los respectivos departamentos para que se realicen las pruebas bioquímicas, moleculares y serológicas, según solicitud.
5. Resuspenda el sedimento e inocule 2 – 3 gotas en los medios COS, ACH, MCK, MSA y medio líquido de enriquecimiento. Separe la muestra en 4 zonas. En el

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 102 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

caso de sospecha de infección por *N. gonorrhoeae*, incluya además el medio selectivo ATM e inocule de manera inmediata. Realice cultivo por hongos, micobacterias y anaerobios en los medios apropiados según solicitud médica.

NOTA: Frente a sospecha clínico epidemiológica (pacientes con artritis monoarticulares crónicas, o hallazgos de lesiones granulomatosas en la anatomía patológica) realizar cultivos para micobacterias y hongos. En el caso de pacientes inmunocomprometidos, el procesamiento para micobacterias y hongos debe realizarse de rutina.

6. Prepare el frotis para la tinción Gram a partir del líquido centrifugado colocando 1-2 gotas en un portaobjetos. No se debe extender el frotis a menos que el material sea purulento y/o grueso. Si cuenta con citocentrífuga, utilice la muestra sin centrifugar que había separado previamente y siga las instrucciones específicas del fabricante para la operación de esta. Fije las láminas preparadas con metanol y proceda a realizar la tinción.
7. Incube COS, ACH y ATM entre 35 y 37°C en atmósfera de capnofilia. El medio líquido y agares MSA y MCK deben incubarse en atmósfera de aerobiosis entre 35 y 37°C.
8. Si está realizando estudio por anaerobios, incube las placas y el caldo de tioglicolato en la incubadora de anaerobiosis. Si no cuenta con cámara de anaerobiosis, utilice técnicas para generar el ambiente e incube. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de incubación y procesamiento de cultivo anaerobio.

Cuadro 10.2 Variaciones en el cultivo de líquido articular dependiendo del volumen y condiciones de la muestra recibida (3).

Volumen	Indicación
< 0, 5 mL	1. Inocule sin diluir el agar ACH y realice un frotis para tinción de Gram 2. Agregue 0,5 mL del medio líquido a la muestra y homogenice con vórtex, de forma que el medio líquido entre en contacto con las paredes del tubo 3. Use este volumen expandido (muestra diluida) e inocule el COS, ATM, MCK, MSA y el medio líquido. Además, prepare un segundo extendido para Gram Nota: En el reporte indique el volumen recibido y la cantidad de caldo agregado.
> 0,5 mL y < 1 mL	1. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, ATM, MSA, MCK) 2. Realice frotis para tinción de Gram 3. Agregue la muestra restante al medio líquido
> 1ml	1. Debe inocularse en una botella de hemocultivo con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido. Debe utilizar el tipo de botella avalada por el fabricante para el cultivo de líquidos de punción. 2. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, ATM, MSA, MCK). 3. Prepare el frotis para tinción de Gram
Muestra coagulada	1. Coloque el coágulo en un homogeneizador de muestras. 2. Añada al homogeneizador 1 mL de solución salina estéril o medio líquido y con suavidad disperse el coágulo para liberar las bacterias atrapadas 3. Inocule todos los medios de cultivo (COS, ACH, ATM, MSA, MCK)

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 103 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

	4. Inocule el medio líquido de enriquecimiento con el material restante.
Solicitud de cultivo por anaerobios	1. Inocule las placas con 2 o 3 gotas de muestra en los medios sólidos. 2. Inocule el medio líquido o la botella de hemocultivo (avalada para la recuperación de bacterias anaerobias). Debe inocularse con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante, considerando la adición del suplemento requerido.

Análisis e interpretación de cultivos (4-5)

Estudio por aerobios

1. Examine todas las placas en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube. Lea diariamente durante 4 días más, para un total de 5 días de incubación.
2. Examine el medio líquido en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas.
 - a. Realice tinción de Gram al caldo ante evidencia de crecimiento y repique en los medios de cultivo correspondientes, según sospecha microbiológica.
 - b. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo, reincube y lea diariamente durante 4 días más en busca de evidencia de crecimiento, para un total de 5 días de incubación.

Estudio por anaerobios

1. Examine a las 48 horas los medios de cultivo para detectar todas las colonias morfológicamente diferentes. Proceda a realizar los re aislamientos necesarios para obtener cultivo puro de cada morfotipo colonial.
2. A cada colonia se le realiza una prueba de aerotolerancia para diferenciar los aerobios y facultativos de los anaerobios. A los aerobios y facultativos que no se hayan detectado en los medios incubados en CO₂ y que se consideren clínicamente significativos, se les realiza identificación.
3. La identificación de los microorganismos anaerobios se debe ajustar a las necesidades clínicas, características microbiológicas de la muestra y posibilidades técnicas del laboratorio. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle de incubación y procesamiento de cultivo anaerobio.

Frascos de hemocultivos

1. Incube los frascos de hemocultivo durante 5 días. Si se detecta crecimiento en la botella, se sigue el mismo procedimiento utilizado para muestras de sangre, indicado en el módulo de hemocultivos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 104 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Proceda a la valoración de cada crecimiento obtenido en los diferentes medios de cultivo y aislamientos de los caldos de enriquecimiento. En cuanto al crecimiento a partir de botellas de hemocultivo, valore y compare con respecto al primocultivo. Realice ID y PSA a los aislamientos con significancia clínica de acuerdo a los estándares vigentes de CLSI. Si el aislamiento es un claro contaminante, proceda únicamente con la ID por el equipo automatizado. Todos los detalles de jerarquización de cultivos de líquido articular se describen en los cuadros 10.3 y 10.4 (1-5,7).

Cuadro 10.3 Principales microorganismos aislados de líquido articular y su interpretación

Microorganismo	Interpretación
<i>Staphylococcus aureus</i>	Microorganismo más frecuente asociado a infección articular (26-63%) . Realice ID y PSA
-Crecimiento en medio sólido o líquidos de los microorganismos: Enterobacterias, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , estreptococos beta hemolíticos del grupo A y B, <i>Streptococcus anginosus</i>	Rara vez son contaminantes. Realice ID y PSA
-Crecimiento en medio sólido o líquido de los microorganismos: <i>Haemophilus influenzae</i> – <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Neisseria meningitidis</i> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> - <i>Kingella kingae</i> – <i>Pasteurella</i> spp. - <i>Borrelia burgdorferi</i> – <i>Mycobacterium tuberculosis</i> – <i>Brucella</i> spp. – <i>Streptobacillus moniliformis</i> - <i>Cryptococcus neoformans</i> - <i>Coccidioides immitis/posadassi</i> - <i>Histoplasma capsulatum</i> - <i>Sporothrix schenckii</i> – <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> - <i>Blastomyces dermatitidis</i> .	Nunca son contaminantes. Reporte ID y PSA sin importar clínica del paciente. Puede presentarse en casos combinados.
-Crecimiento en medio sólido o líquido de los microorganismos: <i>Enterococcus</i> spp.	Evaluar alta probabilidad de contaminación y de enmascaramiento de un patógeno más lábil. Reporte ID y solicite nueva muestra. Solo se jerarquiza si el paciente es neonato, cursa con endocarditis, pie diabético, úlceras decúbito, traumatismo.

Cuadro 10.4 Jerarquización de microorganismos en líquido articular en el contexto de artritis séptica.

Mayor frecuencia
- <i>Staphylococcus aureus</i> (26-63%)
Alta frecuencia
-Estreptococos del grupo viridans (Especialmente <i>Streptococcus anginosus</i>)
- <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Estreptococos de los grupos A y B
Niños, ancianos, inmunodeprimidos y usuarios de drogas por vía intravenosa
-Bacilos Gram negativo fermentadores (Especialmente <i>E. coli</i>)
-Bacilos Gram negativo no fermentadores (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
Baja frecuencia
- <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
- <i>Pasteurella multocida</i>
- <i>Capnocytophaga</i> spp. (mordeduras de perros y gatos)
- <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Eikenella corrodens</i> (mordedura humana)
- <i>Aeromonas hydrophila</i> (leucemia mieloide)
- <i>Staphylococcus no aureus</i> , <i>Propionibacterium</i> y <i>Cutibacterium acnes</i> (articulaciones protésicas)
- <i>Candida</i> spp. (usuarios de drogas vía parenteral)
- <i>Brucella</i> spp, <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mycoplasma fermentans</i> (pacientes con hipogammaglobulinemia, inmunosupresión, linfoma)
- <i>Mycobacterium marinum</i> (exposición al agua)
- <i>Sporothrix schenckii</i> (jardineros).
- <i>Bacillus</i> spp., <i>Nocardia</i> spp. (inoculación de tierra a través de la piel)
Niños menores de 4 años
- <i>Kingella kingae</i>
- <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
Niños menores de 3 meses
- <i>Staphylococcus aureus</i>
- <i>Streptococcus agalactiae</i>
-Bacilos Gram negativo
- <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Infección articular no supurativa
- <i>Borrelia burgdorferi</i>
-Variedad de virus, micobacterias, micoplasmas y hongos

Infecciones polimicrobianas (5-10% de los casos) e infección por bacterias anaerobias (5% de los casos).

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

1. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis, reporte:
 - a. “Cultivo negativo por microorganismos aerobios a los 5 días de incubación”. Modificar los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 106 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

2. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados.
3. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquido incubados en aerobiosis y anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios y anaerobios a los 5 días de incubación”**. Modifique los días de acuerdo a protocolos extendidos para patógenos específicos tamizados
4. Si se observa la presencia de un posible contaminante de acuerdo con los criterios establecidos, reporte:
 - a. **[Identificación del microorganismo]. “Microorganismo se considera generalmente contaminante, valorar bajo contexto clínico del paciente”**.

Reporte de resultados positivos

5. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en líquido articular, reporte:
 - a. **ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

REFERENCIAS

1. Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2015). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-4801-3.00329-5>
2. Costales, C., & Butler-Wu, S. M. (2018). A Real Pain: Diagnostic Quandaries and Septic Arthritis. En C. S. Kraft (Ed.), Journal of Clinical Microbiology (Vol. 56, Issue 2). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/jcm.01358-17>
3. García-Arias, M., Balsa, A., & Mola, E. M. (2011). Septic arthritis. En Best Practice & Research Clinical Rheumatology (Vol. 25, Issue 3, pp. 407-421). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2011.02.001>
4. Marín, M., Esteban, J., Meseguer, M. A., & Sánchez-Somolinos, M. (2010). Diagnóstico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. En Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Vol. 28, Issue 8, pp. 534-540). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.016>
5. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/97815558188146>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 107 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: <i>MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023</i>

6. Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., III, Theel, E. S., Thomson, R. B., Jr, Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. En Clinical Infectious Diseases (Vol.67, Issue 6, pp. e1-e94). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
7. Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
8. Soloaga, R. Guelfand, L.(2020). Curso de Microbiología: Infecciones articulares. Argentina: <https://cababc.org.ar/diagnostico-microbiologico/>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 108 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 11. Diagnóstico microbiológico de infecciones en piel y tejidos blandos: Análisis de hueso

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Osteomielitis: Se define como la infección de la región cortical, médula o ambas estructuras del hueso (1). Puede tener un origen hematógeno distante o contiguo al sitio, así como por inoculación directa de microorganismos en el hueso por procedimientos quirúrgicos o por trauma (2).

Infección asociada con material de osteosíntesis: Se refiere a infecciones relacionadas con el uso de diferentes tipos de implantes para tratamiento en cirugías osteoarticulares, como placas, tornillos, clavos o fijadores externos (1).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de recolección, tipo de muestra, sitio anatómico.
Muestras clínicas indicadas	
-Biopsia ósea: obtenida de forma percutánea o mediante cirugía abierta (1,2).	-Material de osteosíntesis: placas, tornillos, clavos, fijadores, entre otros (1).
Criterios de rechazo	
-Muestras no rotuladas o con datos incongruentes.	-Muestra recibida en recipientes no estériles, con formol o conservantes similares.
-Rechazar muestras en tubos con anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato, ya que tienen más probabilidad de inhibir los microorganismos en las muestras de fluidos y no deben utilizarse (3).	-Muestras derramadas o en las que no se pueda asegurar la esterilidad del recipiente, serán jerarquizadas de acuerdo con la criticidad de las mismas.
-Muestras tomadas con hisopos.	-Exudados de fístulas.
Observaciones	
-Antes de rechazar una muestra, se recomienda comunicarse con el servicio debido a la criticidad de la muestra y dificultad de obtención.	-Se pueden recibir especímenes con solución salina estéril para mantener la hidratación de la muestra. Se debe agregar la cantidad mínima de SS requerida para recubrir la muestra.
Recipiente indicado para la recolección	
-Tubo estéril con tapa de rosca (muestras pequeñas).	-Tubo estéril al vacío para extracción de sangre sin aditivos para fragmentos de huesos pequeños.
-Frasco estéril de boca ancha (muestras grandes).	-Estudio por anaerobios: Idealmente, tubos con medio de transporte para anaerobios pre reducidos. Como alternativa: Tubo al vacío sin aditivos ni anticoagulantes.
Condiciones de transporte (1)	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 109 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en contenedores estériles con cierre hermético que sean apropiados al tamaño y que permitan mantener el espécimen en condiciones adecuadas de humedad, sin añadir formol ni otros preservantes.
-La muestra no debe ser refrigerada ni congelada.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones Generales de Procesamiento

- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.
- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal (1).
- Las muestras deben ser procesadas en una cabina de bioseguridad. Es conveniente conservar cualquier remanente del espécimen posterior a su procesamiento, en caso de que se necesitara realizar verificaciones o estudios posteriores.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 11.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de huesos		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz Vórtex	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF³ Incubadora bacteriológica de CO₂ a 37°C³ Sonicador de baño de baja frecuencia Homogeneizador automatizado de muestras
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Agar MacConkey (MCK) Agar Manitol Sal (MSA) Agar Thayer Martin (ATM)	Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Aguja doble o jeringa	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción de Gram Técnicas moleculares³ Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis³

Medio líquido de enriquecimiento ¹	Macerador de tejidos ³	Medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias ³
---	-----------------------------------	---

1. Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón** (ICC), **Tioglicolato** (TIO) o **Caldo Tripticasa Soya** (CTS).
2. La inclusión de medios de cultivo para hongos o micobacterias debe realizarse según procedimiento local e indicación médica.
3. De acuerdo con las disponibilidades del centro

Procedimiento de la muestra para diagnóstico microbiológico (1)

1. Verifique la rotulación del recipiente con la muestra y valide la información con la solicitud.
 2. Las muestras deben procesarse en una cabina de bioseguridad.
 3. Homogenice los fragmentos o las piezas pequeñas con ayuda de un macerador de tejidos con 2 mL de solución salina estéril o el medio líquido a disposición. Fragmentos de mayor tamaño pueden macerarse con volúmenes mayores de diluyente.
 4. Inocule el macerado en placas de los medios COS, ACH, MCK y MSA en el primer cuadrante de la placa.
 5. Según la sospecha médica y los protocolos locales, proceda de igual manera con el resto de los medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle del procesamiento.
- NOTA:** En caso de sospecha por hongos o micobacterias, siga los procedimientos establecidos para este fin en su centro de trabajo.
6. Extienda el inóculo con distribución por agotamiento en cuatro zonas con asa estéril.
 7. Inocule el medio líquido de enriquecimiento.
 8. Coloque una gota y extienda en un portaobjetos para tinción de Gram. Prepare láminas adicionales si se requiere para otras tinciones.

Muestras de biopsia duras que no se puedan fragmentar: se puede procesar de tres formas distintas según la disponibilidad de equipos que tenga el Laboratorio Clínico:

- a. Homogeneización con vórtex: Añada directamente el medio líquido a la muestra en cantidad suficiente para que cubra el espécimen o agregue directamente el caldo en el recipiente de la muestra. Posteriormente,

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 111 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

homogenice empleando un vórtex, incube a 35-37°C por 24 horas e inocule los medios de cultivo con el caldo, según lo descrito anteriormente.

- b. Uso de homogeneizador automatizado: Coloque en una bolsa estéril (insumo especial y certificado para uso del equipo) con una pequeña cantidad de medio líquido y procese en un homogeneizador automatizado por 5 minutos. Recolecte el medio líquido de la bolsa con una pipeta estéril para proceder con la inoculación de medios de cultivo sólidos y líquido, y preparación de frotis para tinción, según lo descrito anteriormente.
- c. Uso de sonicador: Coloque la muestra en una bolsa estéril para someter a sonicación por 5 minutos. Retire la muestra con pinzas estériles, trasvase asépticamente el líquido a un tubo cónico y centrifugue a 3000g por 20 minutos. Decante el sobrenadante y resuspenda el sedimento en 1/10 del volumen centrifugado de solución salina estéril. Proceda con la inoculación de medios de cultivo sólidos y líquido, y preparación de frotis para tinción, según lo descrito anteriormente.

Muestras de implante o material de osteosíntesis: no se pueden fragmentar, por lo que se pueden procesar de dos formas distintas, según la disponibilidad de equipos que tenga el Laboratorio Clínico:

- a. Homogeneización con vórtex: Añada directamente el medio líquido a la muestra en cantidad suficiente para que cubra el espécimen o agregue directamente el caldo en el recipiente de la muestra. Posteriormente, homogenice empleando un vórtex, incube a 35-37°C por 24 horas e inocule los medios de cultivo sólidos con el caldo, según lo descrito anteriormente.
- b. Uso de sonicador: Coloque en una bolsa estéril de plástico grueso para someter a sonicación por 5 minutos. Retire la muestra con pinzas estériles, trasvase asépticamente el líquido a un tubo cónico y centrifugue a 3000 g por 20 minutos. Decante el sobrenadante y resuspenda el sedimento en 1/10 del volumen centrifugado de solución salina estéril. Proceda con la inoculación de medios de cultivo sólidos y líquido, y preparación de frotis para tinción, según lo descrito anteriormente.

9. Incube como sigue:

- a. ACH y COS a 35-37°C en capnofilia, por 48 horas como mínimo. Se puede extender hasta por 5 días según el caso, valorando la pertinencia clínica y sospecha de patógenos de lento crecimiento.
- b. MCK y MSA a 35-37°C en aerobiosis, por 48 horas como mínimo.
- c. El medio líquido de enriquecimiento a 35-37°C en aerobiosis, por 5 días con revisión diaria. Realice tinción de Gram al caldo ante evidencia de

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 112 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

crecimiento y repique en los medios de cultivo correspondientes, según sospecha microbiológica.

- d. Medios de anaerobiosis en atmósfera específica a 35-37°C, por 7 días con revisión a las 48 horas y a los 5 días. Refiérase al módulo 18 para mayor detalles.

10. Realice pruebas preliminares para identificación de grupos bacterianos tras análisis e interpretación del crecimiento en cultivo (oxidasa, catalasa, coagulasa, tinción de Gram), en caso de que sea solicitado por el personal médico para orientar la terapia antimicrobiana.
11. Realice ID y PSA de acuerdo con los estándares vigentes de CLSI tras análisis e interpretación del crecimiento en cultivo.

Análisis e interpretación de cultivos

- o La revisión inicial de los cultivos debe basarse en la búsqueda de los patógenos clínicamente relevantes. No obstante, se debe considerar la posibilidad de recuperar microbiota de la piel como *S. epidermidis* y otros SOSA, los cuales pueden ser considerados como contaminantes excepto en caso de materiales de osteosíntesis y/o muestras representativas de un proceso infeccioso (1).
- o Si se observa crecimiento en los medios sólidos, realice la identificación presuntiva del microorganismo aislado mediante tinción de Gram y pruebas complementarias (catalasa, coagulasa, oxidasa u otros, según lo que sugiera la morfología colonial).
- o Si se obtiene cultivos mixtos, realice la separación correspondiente para obtener cultivos puros y realizar ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI, a menos que el aislado sea claramente un contaminante. El aislamiento de SOSA únicamente en cultivo líquido no se identifica ni se realiza PSA a menos que provenga de material de osteosíntesis.
- o El número máximo de morfotipos a trabajar debe ser definido por cada centro.
- o El cuadro 11.2 resume los patógenos más frecuentes en infecciones de hueso y material de osteosíntesis. Fue tomado y modificado de diferentes autores para consolidar la información requerida en este análisis (2-5).
- o El hallazgo de los siguientes microorganismos: SOSA, difteroides, *Bacillus spp*, micrococos, *C. acnes*, representan una alta probabilidad de contaminación o enmascaramiento de un patógeno más lábil; por lo cual, se debe evaluar cada caso.
- o En cuanto a los SOSA, se deben considerar factores de riesgo como la osteomielitis esternal que sigue a la cirugía de tórax, pacientes hemodializados, pie diabético, úlceras por decúbito y pacientes con prótesis osteoarticulares. En materiales de

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 113 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

osteosíntesis, *S. epidermidis* y *S. aureus* son los principales agentes etiológicos, seguidos de estreptococos, enterococos y bacilos Gram negativo.

Cuadro 11.2 Principales patógenos de infecciones osteoarticulares

Origen de infección ósea	Microorganismos relacionados
Hematógena	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> spp, <i>Burkholderia pseudomallei</i> , <i>Brucella</i> spp., <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Traumática	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Propionibacterium</i> spp., <i>Kingella kingae</i> , Enterobacterales, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Pasteurella multocida</i> , anaerobios, <i>Nocardia</i> , actinomicetes, micobacterias atípicas.
Problemas vasculares	Enterobacterales, anaerobios.
Asociada a la atención en salud	Se debe jerarquizar los diferentes microorganismos encontrados de acuerdo con la patología de fondo, microbiología local y posibles focos infecciosos.

FASE POST ANALÍTICA

Reporte Tinción Gram

Las tinciones de Gram se observan e informan lo más rápido posible en tiempo y forma. Las muestras intraoperatorias se deben informar con carácter de urgencia. Reporte todos los microorganismos presentes, así como la presencia de leucocitos y su distribución. Determine el número de células y microorganismos, basándose en el cuadro 11.3 (4).

Cuadro 11.3 Componentes del reporte de tinción de Gram en muestras clínicas

Tipo de célula	Cuantificación en cruces (utilizar lente 10X)
Células epiteliales	No se observan
Leucocitos	1+ : Menos de 1/campo 2+ : De 1 a 9 / campo 3+ : de 10-25/ campo 4+ : Mas de 25/campo
Tipo de microorganismo observado	Cuantificación en cruces (Observar en lente de inmersión)
Cocos Gram Positivo Bacilos Gram Positivo Cocobacilos Gram Positivo Diplococos Gram Positivo Bacilos Gram Negativo Diplococos Gram Negativo Cocobacilos Gram Negativo Cocos Gram Negativo Bacilos Gram variable Cocobacilos Gram Variable Levaduras Micelio	No se observan 1+ : Menos de 1/campo 2+ : De 1 a 5/ campo 3+ : de 6-30/ campo 4+ : Mas de 30/campo
Adicionalmente, se puede describir el arreglo microscópico observado: en cadenas, en grumos, lanceolados, ramificados, filamentosos, tipo corinebacteria o difteroides, fusiforme, curvo, entre otros.	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 114 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Reporte de resultados negativos

1. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios”.**
2. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos anaerobios”.**
3. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis y anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios y anaerobios”.**
4. Si se observa la presencia de un posible contaminante de acuerdo con los criterios establecidos, reporte:
 - a. **[Identificación del microorganismo]. “Microorganismo se considera generalmente contaminante, valorar bajo contexto clínico del paciente”.**
5. Crecimiento polimicrobiano (que excede el máximo de morfotipos definido por centro), reporte:
 - a. **“Crecimiento polimicrobiano de múltiples morfotipos, lo cual limita la interpretación. Se sugiere repetir toma de muestra, de ser posible”.**

Reporte de resultados positivos

Antes de emitir los informes de resultados, evalúe de forma conjunta los resultados de todas las muestras de un mismo paciente. Tome en cuenta los resultados de la tinción de Gram y su concordancia con los aislamientos de los cultivos. Consigne en el informe de resultados todos los microorganismos aislados con relevancia clínica (el número máximo de morfotipos a trabajar debe ser definido por cada centro) y su sensibilidad a los diferentes antimicrobianos.

6. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en hueso, reporte:
 - a. **ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 115 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

REFERENCIAS

1. Cercenado, E. Cantón R. Diagnostico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. Procedimientos de microbiología clínica. SIEMC, 2009
2. J Michael Miller, Matthew J Binnicker, Sheldon Campbell, Karen C Carroll, Kimberle C Chapin, *et al.*, A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 67, Issue 6, 15 September 2018, Pages e1–e94, <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
3. Jorgensen, J. H., Carrol, K. C. & Funke, G. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C. ASM Press. 2015.
4. Leber A., Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM PRESS, 2016
5. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8va Ed. Elsevier Inc., 2015

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 116 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 12. Diagnóstico Microbiológico de infecciones de piel y tejidos blandos

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

El espectro de infecciones de piel y tejidos blandos abarca desde procesos leves hasta cuadros graves con afección sistémica. Se incluyen:

- Infecciones superficiales (impétigo, forunculosis, erisipelas, heridas quirúrgicas).
- Infecciones del tejido celular subcutáneo y abscesos (celulitis y fascitis).
- Miositis (incluyendo la gangrena gaseosa y los abscesos musculares).
- Linfadenitis y linfangitis.
- Infecciones por traumas.

La presentación de estas infecciones es muy variada. Pueden presentarse como heridas abiertas o lesiones cerradas, agudas o crónicas. Se incluyen en este módulo las infecciones asociadas a heridas quirúrgicas, quemaduras e infecciones de pie diabético (3,4).

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de recolección, tipo de muestra, sitio anatómico
Muestras clínicas indicadas	
- <u>Aspirado por punción</u>	- <u>Biopsia o tejido</u>
- <u>Úlceras superficiales</u> : asepsia del sitio, debridación del tejido expuesto y recolección del material en la zona profunda de la úlcera. Tejido o aspiración de líquido (no sangre).	- <u>Abscesos superficiales</u> : debridar tejido. - <u>Abscesos profundos</u> : aspirar con catéter, sondas o cirugías.
Criterios de rechazo	
-Muestras no rotuladas o con datos incongruentes.	-Muestra recibida en recipientes no estériles, con formol o conservantes similares.
-Rechazar muestras en tubos con anticoagulantes como heparina, EDTA y citrato, ya que tienen más probabilidad de inhibir los microorganismos en las muestras de fluidos y no deben utilizarse (3).	-Muestras derramadas o en las que no se pueda asegurar la esterilidad del recipiente, serán jerarquizadas de acuerdo con la criticidad de las mismas.
-Exudados de fístulas	-Hisopados en torundas sin medio de transporte AMIES
Observaciones (2,4,5).	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 117 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

-El uso de hisopos puede permitirse de manera excepcional para algunas muestras, siempre y cuando sean flocados, con medio de transporte AMIES y la muestra sea recolectada de conformidad con las guías vigentes.	-De no ser posible recolectar una muestra apropiada, no se debe enviar especímenes inadecuados de los pliegues superficiales de la piel al Laboratorio Clínico, como en el caso de erisipelas, celulitis sin abscesos formados, forúnculos, impétigos.
-En muestras tomadas con jeringa, una vez realizada la aspiración se debe transferir a un tubo o recipiente estéril.	-Se pueden recibir especímenes con solución salina estéril para mantener la hidratación de la muestra. Se debe agregar la cantidad mínima de SS requerida para recubrir la muestra.
-Antes de rechazar una muestra de tejidos, biopsias o aquellas tomadas durante procedimientos quirúrgicos, se recomienda comunicarse con el servicio debido a la criticidad de la muestra y dificultad de obtención.	
Recipiente indicado para la recolección (2,4,5).	
-Tubo estéril con tapa de rosca (muestras pequeñas).	-Tubo estéril al vacío para extracción de sangre sin aditivos (muestras pequeñas).
-Frasco estéril de boca ancha (muestras de mayor tamaño).	-<u>Estudio por anaerobios</u>: Idealmente, tubos con medio de transporte para anaerobios pre reducidos. Si bien el Chopped Meat no es un medio de transporte, puede emplearse para este fin. Como alternativa: Tubo al vacío sin aditivos ni anticoagulantes.
Condiciones de transporte	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en contenedores estériles con cierre hermético que sean apropiados al tamaño y que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad, sin añadir formol ni otros preservantes.	
-La muestra no debe ser refrigerada ni congelada (2,4).	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento

- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.
- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal (1,2-5).
- Las muestras deberán ser procesadas en una cabina de bioseguridad (4,5).
- Es conveniente conservar cualquier remanente de la muestra posterior a su procesamiento, en caso de que se necesitara realizar verificaciones o estudios posteriores (5).

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 12.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de muestras de tejidos blandos		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz Vórtex	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF ³ Incubadora bacteriológica de CO2 a 37°C ³ Sonicador de baño de baja frecuencia Homogeneizador automatizado de muestras
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Agar MacConkey (MCK) Agar Manitol Sal (MSA) Agar Thayer Martin (ATM) Medio líquido de enriquecimiento ¹	Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Aguja doble o jeringa Macerador de tejidos ³	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción Gram Técnicas moleculares ³ Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis ³ Medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias ³

- Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón** (ICC), **Tioglicolato** (TIO) o **Caldo Trypticase Soya** (CTS).
- La inclusión de medios de cultivo para hongos o micobacterias debe realizarse según procedimiento local e indicación médica.
- Según disponibilidad del centro

Procedimiento para diagnóstico microbiológico (1,4,5).

- Verifique la rotulación del recipiente con la muestra y valide la información con la solicitud.
- Las muestras deben procesarse en una cabina de bioseguridad.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 119 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

3. Homogenice los fragmentos o las piezas pequeñas con ayuda de un macerador de tejidos con 2 mL de solución salina estéril o medio líquido. Fragmentos de mayor tamaño pueden macerarse con volúmenes mayores de diluyente.
4. Inocule el macerado en placas de los medios COS, ACH, MCK y MSA en el primer cuadrante de la placa.
5. Según la sospecha médica y los protocolos locales, proceda de igual manera con el resto de los medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle del procesamiento.
6. Extienda el inóculo con distribución por agotamiento en cuatro zonas con asa estéril.
7. Inocule el medio líquido de enriquecimiento.

NOTA: En caso de sospecha por hongos o micobacterias, siga los procedimientos establecidos para este fin en su centro de trabajo.

8. Los aspirados por punción se procesan mediante inoculación directa en los medios de cultivo de interés, según se mencionó anteriormente.
9. Coloque una gota y extienda en un portaobjetos para tinción de Gram. Prepare láminas adicionales si se requiere otras tinciones.
10. Se sugiere limitar el uso de botellas de cultivo automatizado para muestras invasivas, tomadas en sala de operaciones, como abscesos intraórganos. En cuyo caso debe inocular la botella con un mínimo de 1 mL y el máximo debe revisarse con las especificaciones técnicas del fabricante. Se debe sembrar de forma complementaria los medios sólidos mencionados anteriormente.

Biopsias grandes que no se puedan macerar: se pueden procesar de dos formas distintas según la disponibilidad de equipos que tenga el Laboratorio Clínico:

- a. Homogeneización con vórtex: Añada directamente en un caldo de enriquecimiento en cantidad suficiente para que cubra el espécimen o agregue el caldo directamente en el recipiente de la muestra. Posteriormente, homogenice empleando un vórtex, incube a 35-37°C por 24 horas e inocule los medios de cultivo sólidos con el caldo, según lo descrito anteriormente.
- b. Uso de homogeneizador automatizado: Coloque en una bolsa estéril con una pequeña cantidad de medio de cultivo y procese en un homogeneizador automatizado por 5 minutos. Recolecte el medio de cultivo de la bolsa con una pipeta estéril para proceder con la inoculación de medios de cultivo sólidos y líquidos, y preparación de frotis para tinción, según lo descrito anteriormente.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 120 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

11. Incube como sigue:

- a. ACH y COS a 35-37°C en capnofilia, por 48 horas como mínimo. Se puede extender hasta por 5 días según el caso, valorando la pertinencia clínica y sospecha de patógenos de lento crecimiento.
- b. MCK y MSA a 35-37°C en aerobiosis, por 48 horas como mínimo.
- c. El medio líquido a 35-37°C en aerobiosis, por 5 días con revisión diaria. Realice tinción de Gram al caldo ante evidencia de crecimiento y repique en los medios de cultivo correspondientes, según sospecha microbiológica.
- d. Medios de anaerobiosis en atmósfera específica a 35-37 °C, por 7 días con revisión a las 48 horas y a los 5 días. Refiérase al módulo 18 para mayor detalle.

12. Realice pruebas preliminares para identificación de grupos bacterianos tras análisis e interpretación del crecimiento en cultivo (oxidasa, catalasa, coagulasa, tinción de Gram), en caso de que sea solicitado por el personal médico para orientar la terapia antimicrobiana.

13. Realice ID y PSA de acuerdo con los estándares vigentes de CLSI tras análisis e interpretación del crecimiento en cultivo.

Análisis e interpretación de cultivos (3,4,5)

- o La revisión inicial de los cultivos debe basarse en la búsqueda de los patógenos clínicamente relevantes. No obstante, existe la posibilidad de recuperar microbiota de la piel como *S. epidermidis* y otros SOSA, los cuales pueden ser considerados como contaminantes excepto en casos de muestras representativas de un proceso infeccioso (evidenciado por la presencia de células inflamatorias en la tinción de Gram para muestras de aspirado obtenidas por punción).
- o Si se observa crecimiento en los medios sólidos, realice la identificación presuntiva del microorganismo aislado mediante tinción de Gram y pruebas complementarias (catalasa, coagulasa, oxidasa u otros, según lo que sugiera la morfología colonial).
- o Si las botellas de cultivo automatizado aerobio y anaerobio resultan positivas, realice subcultivos en los medios para aerobios o anaerobios según corresponda y de acuerdo con las condiciones anteriormente descritas.
- o Si se obtiene cultivos mixtos, separe para obtener cultivos puros correspondientes. El número máximo de morfotipos a trabajar debe ser definido por cada centro. Realice ID y PSA de acuerdo con los estándares vigentes de la CLSI, a menos que el aislado sea claramente un contaminante.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 121 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- El aislamiento de SOSA únicamente en cultivo líquido no se identifica ni se realiza PSA, a menos que la muestra sea representativa de un proceso infeccioso (evidenciado por la presencia de células inflamatorias en la tinción de Gram para muestras de aspirado obtenidas por punción).
- La obtención de escaso crecimiento de agentes patógenos en muestras con poca evidencia de reacción inflamatoria debe investigarse y determinar si existe relación entre el agente y el proceso infeccioso.
- En las muestras de tejido, el frotis puede no ser lo suficientemente representativo para valorar la calidad de la muestra, por lo que no se sugiere considerarlo como criterio para la jerarquización de agentes patógenos.
- El cuadro 12.2 resume los patógenos más frecuentes en infecciones de piel y tejidos blandos.

Cuadro 12.2 Principales patógenos de infecciones en piel y tejidos blandos

Tipo de lesión	Agentes etiológicos frecuentemente aislados
	Piodermas primarias
Impétigo	<i>S. aureus</i> , estreptococos del grupo A
Foliculitis	<i>S. aureus</i> , <i>Candida</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>M. furfur</i>
Forúnculos y ántrax	<i>S. aureus</i>
Paroniquia	<i>S. aureus</i> , estreptococos del grupo A, <i>Candida</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Ectima	Estreptococos del grupo A
Erisipela	Estreptococos del grupo A
Úlceras membranosas	<i>Corynebacterium diptheriae</i>
Celulitis	<i>S. aureus</i> , estreptococos del grupo A o de otros grupos
Absceso cerebral	<i>S. aureus</i> , Enterobacterales, estreptococos de los grupos <i>milleri</i> , <i>viridans</i> y <i>anguinosus</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Propionibacterium</i> spp., <i>P. aeruginosa</i>
Absceso periorbital y orbital	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , anaerobios, estreptococos del grupo <i>anguinosus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i>
Absceso peritonsilar	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>A. haemolyticum</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp.
Absceso retrofaríngeo	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , anaerobios, estreptococos del grupo <i>anguinosus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>
Absceso mamario	<i>S. aureus</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Actinomyces europeus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>C. acnes</i>
Absceso en cuello	<i>S. aureus</i> , <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.
Absceso pulmonar	<i>S. pneumoniae</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , anaerobios, estreptococos del grupo <i>viridans</i> , Enterobacterales
Absceso hepático o intraabdominal	Enterobacterales, <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. multocida</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.
Absceso cutáneo	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. agalactiae</i>
Absceso ovárico	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp., Enterobacterales, <i>Chlamydia trachomatis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Absceso perirectal	<i>S. aureus</i> , Enterobacterales y anaerobios
Abscesos en tracto genital femenino	Etiología anaerobia

Gangrena infecciosa y celulitis gangrenosa	
Gangrena estreptocócica y fascitis necrosante	Estreptococos del grupo A, infecciones polimicrobianas con anaerobios y enterobacterias
Gangrena gaseosa, celulitis crepitante	<i>C. perfringens</i> y otros clostridios, <i>Bacteroides</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>E. coli</i>
Infecciones secundarias a lesiones preexistentes	
Quemaduras	<i>P. aeruginosa</i> , estreptococos, enterococos, <i>S. aureus</i> , Enterobacterales, SOSA, anaerobios, <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> .
Dermatitis, eritrodermias exfoliativas	<i>S. aureus</i> , estreptococos del grupo A
Úlceras crónicas*	<i>S. aureus</i> , estreptococos, Enterobacterales, <i>P. aeruginosa</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp.
Mordeduras	<i>Actinobacillus</i> spp, <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>E. rhusiopathiae</i> , <i>Pasteurella</i> spp., <i>Streptobacillus</i> spp., <i>Eikenella</i> spp.
Herida de sitio quirúrgico	<i>S. aureus</i> , SOSA, estreptococos, enterococos, <i>Acinetobacter</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , Enterobacterales, anaerobios.
Traumática	<i>S. aureus</i> , estreptococos de los grupos A, B, C y D, <i>Aeromonas</i> spp., <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Corynebacterium</i> .
Erupciones vesiculares	<i>S. aureus</i> , estreptococos del grupo A

*Se incluyen las úlceras de pie diabético, en donde los casos complicados tienden a tener una etiología polimicrobiana (3,4,5).

FASE POSANALÍTICA

Reporte Tinción Gram

Las tinciones de Gram se observan e informan lo más rápido posible en tiempo y forma. Las muestras intraoperatorias se deben informar con carácter de urgencia. Se reportan todos los microorganismos presentes, así como la presencia de leucocitos y su distribución. Determine el número de células y microorganismos, basándose en el cuadro 12.3 (4).

Cuadro 12.3 Componentes del reporte de tinción de Gram en muestras clínicas

Tipo de célula	Cuantificación en cruces (utilizar lente 10X)
Células epiteliales	No se observan
Leucocitos	1+: Menos de 1/campo 2+: De 1 a 9 / campo 3+: de 10-25/ campo 4+: Mas de 25/campo
Tipo de microorganismo observado	Cuantificación en cruces (Observar en lente de inmersión)
Cocos Gram Positivo Bacilos Gram Positivo Cocobacilos Gram Positivo Diplococos Gram Positivo Bacilos Gram Negativo Diplococos Gram Negativo Cocobacilos Gram Negativo Cocos Gram Negativo	No se observan 1+: Menos de 1/campo 2+: De 1 a 5/ campo 3+: de 6-30/ campo 4+: Mas de 30/campo

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 123 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Bacilos Gram variable Cocobacilos Gram Variable Levaduras Micelio	
Adicionalmente, se puede describir el arreglo microscópico observado: en cadenas, en grumos, lanceolados, ramificados, filamentosos, tipo corinebacteria o difteroides, fusiforme, curvo, entre otros.	

Reporte de resultados negativos

1. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios”.**
2. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivos sólidos y líquido incubados en anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos anaerobios”.**
3. Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos y líquidos incubados en aerobiosis y anaerobiosis, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos aerobios y anaerobios”.**
4. Si se observa la presencia de un posible contaminante de acuerdo con los criterios establecidos, reporte:
 - a. **[Identificación del microorganismo]. “Microorganismo se considera generalmente contaminante, valorar bajo contexto clínico del paciente”.**
5. Crecimiento polimicrobiano (que excede el máximo de morfotipos definido por centro), reporte:
 - a. **“Crecimiento polimicrobiano de múltiples morfotipos, lo cual limita la interpretación. Se sugiere repetir toma de muestra, de ser posible”.**

Reporte de resultados positivos

Antes de emitir los informes de resultados, evalúe de forma conjunta los resultados de todas las muestras de un mismo paciente. Tome en cuenta los resultados de la tinción de Gram y su concordancia con los resultados de los cultivos. Consigne en el informe de resultados todos los microorganismos aislados con relevancia clínica (El número máximo de morfotipos a trabajar debe ser definido por cada centro) y su sensibilidad a los diferentes antimicrobianos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 124 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

1. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en piel y tejidos blandos, reporte:

a. ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

REFERENCIAS

1. Cercenado, E. Cantón R. Diagnostico microbiológico de las infecciones osteoarticulares. Procedimientos de microbiología clínica. SIEMC, 2009
2. J Michael Miller, Matthew J Binnicker, Sheldon Campbell, Karen C Carroll, Kimberle C Chapin, *et al.*, A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 67, Issue 6, 15 September 2018, Pages e1–e94, <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
3. Jorgensen, J. H., Carrol, K. C. & Funke, G. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C. ASM Press. 2015.
4. Leber A., Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM PRESS, 2016
5. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8va Ed. Elsevier Inc., 2015

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 125 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 13 Diagnóstico Microbiológico de Infecciones Genitales

FASE PREANALITICA

Solicitud de análisis: cuadros clínicos asociados (1-2)

Las infecciones del tracto genital están causadas tanto por microorganismos exógenos como por microorganismos de la microbiota del paciente. Dentro de estas infecciones, destacan las de transmisión sexual (ETS), para las cuales se aconseja una aproximación sindrómica, donde se utilicen diferentes técnicas diagnósticas de manera integrada. Se incluyen los siguientes cuadros clínicos:

- Infecciones ulcerativas: lesión herpética, sífilis, linfogranuloma venéreo (LGV), chancro blando, granuloma inguinal y úlceras perineales.
- Infecciones supurativas: uretritis, cervicitis, proctitis, vaginitis, bartolinitis, endometritis, salpingitis, skenitis, balanopostitis, epididimitis, orquitis, absceso prostático y prostatitis.
- Disbiosis: vaginosis bacteriana.

Muestras clínicas, transporte y conservación (1).

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, edad y especificar si corresponde a una paciente embarazada, terapia antimicrobiana.
Datos de la muestra	Fecha y hora de la toma. Servicio que envía la muestra. Diagnóstico clínico asociado a la infección genital. Técnica de obtención de la muestra.
Muestras clínicas indicadas	
-Hisopados de secreción vaginal, vulvar, endocervicales, secreción uretral.	-Tejido de sitios anatómicos con evidencia de inflamación.
-Raspados o hisopados con material/exudado de úlceras genitales.	-Aspirados de abscesos o glándulas: se deben recolectar por aspiración y enviarse a la mayor brevedad al laboratorio para su procesamiento.
-Muestras invasivas recolectadas durante procedimientos quirúrgicos.	-Orina y medios de citología líquida para técnicas moleculares.
Criterios de rechazo	
-Nunca rechace muestras críticas o irremplazables sin previa consulta con el médico encargado. Notificar en el informe los motivos que comprometieron el correcto procesamiento de la muestra.	-Muestras sin identificación, en recipientes inadecuados, con discrepancias entre los datos de la solicitud médica y la muestra, inadecuadas para el tipo de análisis, o solicitudes médicas que no indiquen el análisis deseado.
-Hisopos sin medio de transporte o secos.	-Torundas vaginales de mujeres en edad reproductiva para "cultivo genital de rutina".
-Muestras que han transcurrido más de 2 horas desde la recolección.	-Muestras tomadas con torundas de algodón ó alginato de Calcio.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 126 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

-Hisopados vaginales para la recuperación de <i>N. gonorrhoeae</i> en mujeres adultas (debe ser endocervical). Nota: el hisopado vaginal puede ser una muestra válida para preadolescentes o niñas (por sospecha de ITS debido a abuso).
Recipiente indicado para la recolección
-Para la recolección de muestras de hisopados vaginales, endocervicales o uretrales—así como faríngeos o rectales cuando se sospeche infecciones en esos sitios – se requiere de un hisopo flocado o bien una torunda de dacrón o rayón con medio de transporte específico como el Medio Stuart o AMIES (preferiblemente en formato líquido). -Para el examen al fresco en busca de <i>T. vaginalis</i> se debe recolectar el exudado vaginal con hisopos flocados, en medio de transporte AMIES líquido.
Condiciones de transporte
-Se debe transportar la muestra a temperatura ambiente en 2 horas o menos al Laboratorio Clínico. -Si la muestra debe ser tomada en un punto externo al centro de salud y no puede ser enviada de inmediato, esta debe mantenerse en refrigeración a 4°C. Su envío debe realizarse en las próximas 8 horas, garantizando la cadena de frío en todo momento. -Las muestras obtenidas para ensayos de detección molecular deben cumplir con las especificaciones del fabricante.

En el anexo de este módulo, en los cuadros 13.6 - 13.7 y 13.8, se detalla las principales pruebas diagnósticas, tipo de muestra y agentes etiológicos más frecuentes para las diferentes infecciones genitales (2).

FASE ANALÍTICA

Condiciones generales para el procesamiento (1).

- El presente módulo se enfoca en el procesamiento de muestras para el diagnóstico de infecciones ulcerativas, disbiosis, uretritis, vaginitis y cervicitis. Para el abordaje de otras infecciones supurativas debe referirse al protocolo establecido en los módulos 10 (piel y tejidos blandos) y 18 (anaerobios).
- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.
- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal.
- Cualquier aislamiento de agentes patógenos de transmisión sexual es considerado significativo indistintamente del sitio del tracto genital en el que se encuentre.
- Las muestras deberán ser procesadas en una cabina de bioseguridad.
- Se debe hacer una valoración de la prueba de laboratorio solicitada y el diagnóstico referido o indicado, para decidir el procesamiento más adecuado que permita el mayor rendimiento diagnóstico posible, en ocasiones ampliando las determinaciones solicitadas y, en otros casos, restringiéndolas.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 127 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Es conveniente conservar cualquier remanente de la muestra posterior a su procesamiento, en caso de que se necesitara realizar verificaciones o estudios posteriores.
- Las muestras referidas para ensayos moleculares deben procesarse e interpretarse de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- Para la vaginosis bacteriana, la tinción de Gram es más sensible que las técnicas que buscan detectar únicamente la presencia de *Gardnerella vaginalis*.
- La detección simultánea de *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Trichomonas vaginalis* es el acercamiento óptimo para diagnosticar las ETS más comunes en pacientes femeninas.
- *Mycoplasma genitalium* es un agente emergente que causa uretritis no gonocócica en hombres, así como cervicitis y enfermedad pélvica inflamatoria en mujeres. En caso de resultados negativos para los agentes más comunes de ETS, descarte también la presencia de *M. genitalium*.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 13.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de muestras vaginales		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ¹
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF Incubadora bacteriológica de CO₂ a 37°C Microscopio adaptado con Campo oscuro Sistema miniaturizado de ID bioquímica rápida
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Agar Thayer-Martin (ATM)	Reactivos para tinción Gram Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia Indicadores REDOX	Oxidasa Catalasa Cefinasa Técnicas moleculares¹

Medios de cultivo para hongos ²	Portaobjetos Cubreobjetivos	
--	--------------------------------	--

1. Según disponibilidad del centro
2. Bajo solicitud médica: Solo es necesario recuperar *Candida* mediante Agar Sabouraud. El empleo de medios cromogénicos es complementario.

Procedimiento de la muestra para diagnóstico microbiológico (1)

Procesamiento de las muestras por técnicas directas

Microscopía por campo oscuro para *Treponema pallidum*: se usa para demostrar la presencia de *Treponema pallidum*. La muestra debe ser procesada como máximo 20 minutos después de recolectada.

1. Coloque el exudado entre portaobjetos y cubreobjetos.
2. Siga las instrucciones de operación como lo indica el fabricante del microscopio de campo oscuro.
3. Revise de inmediato en busca de microorganismos espirales o espiroquetas.

NOTA: Se recomienda realizar la prueba de VDRL en sangre de forma complementaria.

Examen al fresco en exudados vaginales: Permite demostrar la presencia de *Trichomonas vaginalis*, estructuras fúngicas, células guía, leucocitos y otros elementos celulares para el diagnóstico de vaginitis o vaginosis bacteriana.

1. Reciba la muestra, recolectada con hisopo en medio de transporte AMIES en presentación líquida.
2. En caso de recibir muestra de orina, centrifugue a 500g y analice el sedimento.
3. Coloque de 2 - 3 gotas de la suspensión (o el sedimento) entre portaobjetos y cubreobjetos.
4. Examine en el microscopio (a 40X) al menos 20 campos buscando la presencia de leucocitos, células epiteliales, células guía (células epiteliales recubiertas de bacterias), *T. vaginalis* y estructuras fúngicas.

Tinción de Gram en exudados vaginales:

1. Realice el extendido de la muestra en el portaobjetos, fije el frotis con metanol absoluto durante 5 minutos y proceda con la tinción de Gram.
2. Observe el frotis teñido en el microscopio utilizando lente de inmersión.
3. Reporte la celularidad y distribución de leucocitos, estructuras fúngicas o algún otro morfotipo predominante. Respecto a la presencia de diplococos Gram negativo intracelulares y/o extracelulares, se debe retener el reporte de la tinción de Gram, hasta confirmar el aislamiento de *Neisseria gonorrhoeae* por cultivo.
4. Para evaluar vaginosis bacteriana, realice una comparación entre el número relativo de lactobacilos (bacilos Gram positivo de tamaño mediano a largo) y los bacilos Gram negativo curvos, así como los cocobacilos Gram variable pleomórficos, anotando el score según criterio de Nugent, representado en el cuadro 13.2 (4).
5. Contabilice los puntos según los criterios anteriores y reporte de la siguiente forma:
 - a. Puntuación 0-3: "Morfotipos consistentes con microbiota vaginal normal"
 - b. Puntuación 4-6: "Morfotipos mixtos consistentes con transición de la microbiota vaginal normal"
 - c. Puntuación 7-10: "Morfotipos mixtos consistentes con vaginosis bacteriana"

Cuadro 13.2. Interpretación de la tinción de Gram según criterios de Nugent

CRITERIOS DE NUGENT		
Morfología	Recuento/Campo de inmersión	Puntuación
Bacilos Gram positivo con morfología de <i>Lactobacillus</i> spp.	>30	0
	5-30	1
	1-4	2
	<1	3
	0	4
Bacilos Gram negativo con morfología de <i>Gardnerella</i> spp. (cocobacilos pleomórficos), <i>Bacteroides</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.	>30	4
	5-30	3
	1-4	2
	<1	1
	0	0
Bacilos Gram negativo curvos	>5	2
	< 1-4	1
	0	0

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 130 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Procesamiento de las muestras por cultivo

1. Inocule el hisopo en placas de los medios COS, ACH y ATM en el primer cuadrante de la placa. Proceda de igual manera con el resto de medios de cultivo que tenga disponibles o si se sospecha específicamente de algún agente (Agar Sabouraud, Medio cromogénico para *Candida* spp.).
2. Extienda el inóculo con distribución por agotamiento en cuatro zonas con asa estéril.
3. Incube como sigue:
 - a. ACH, COS y ATM a 35-37°C en capnofilia, por 48 horas como mínimo y en ambiente húmedo. En caso de sospecha por *Haemophilus ducreyi*, las placas de ACH deben ser conservadas hasta 5 días.
 - b. Agar Sabouraud (opcionalmente medios cromogénicos para *Candida*) a 35-37°C en aerobiosis, por 48 horas como mínimo.

Análisis e interpretación de cultivos (1)

1. Realice la lectura de las placas, aíse en cultivo puro e identifique microorganismos patógenos: Realice ID y PSA (si corresponde) de acuerdo con los estándares vigentes de CLSI tras análisis e interpretación del crecimiento en cultivo.
 - a. ***Neisseria gonorrhoeae*:**
 - i. Sospeche cuando hay crecimiento de colonias en ATM y ACH. Las colonias son pequeñas, elevadas, grises y mucoides con márgenes enteros. Es posible que crezca también en COS como colonias pequeñas transparentes. Para identificación preliminar puede realizar una tinción de Gram (diplococo Gram negativo), una prueba de oxidasa (positiva) y una prueba de catalasa (positiva). Realice la prueba de cefinasa, cuyo resultado positivo predice la resistencia a la penicilina, ampicilina y amoxicilina.
 - ii. Si cuenta con métodos moleculares, realice las pruebas correspondientes según las indicaciones del fabricante.
 - iii. Refiera todos los aislamientos de *Neisseria gonorrhoeae* al centro referencia para su caracterización epidemiológica.
 - b. ***Haemophilus ducreyi*:**
 - i. Las colonias son de distintos tamaños, lisas, con forma de cúpula, de color ligeramente amarillo a gris, y la colonia se desliza completamente al tocarla con un asa. En la tinción de Gram, las

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 131 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

colonias se agrupan al colocarlas en solución salina y se observan como cocobacilos Gram negativo en cadenas.

- ii. Los sistemas automatizados basados en la realización de pruebas bioquímicas, suelen tener limitaciones para la identificación de *Haemophilus ducreyi*. En caso de tener colonias sugestivas de este patógeno, se debe referir al centro de referencia para su correspondiente identificación.
- c. Otros patógenos importantes: ***Candida albicans* y otras levaduras, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*.**
- d. Jerarquice bacilos Gram negativo (Enterobacterales, no fermentadores, *Pasteurella bettyae*, *Capnocytophaga* spp., *Campylobacter fetus*) *Haemophilus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* u otros agentes, siempre y cuando predominen en las placas, se haya observado en la tinción de Gram junto con células inflamatorias y sea coherente con las manifestaciones clínicas del paciente; o bien, se trate de una muestra que se haya recolectado por métodos invasivos.
- e. La presencia de microbiota patológica se puede aproximar a partir de la tinción de Gram, cuyo valor diagnóstico es superior al cultivo.
- f. Los cuadros 13.3 y 13.4 detallan los patógenos más frecuentes en infecciones a nivel de tracto genital femenino y masculino (1).
- g. El hallazgo de microorganismos relacionados con infecciones de transmisión sexual en niños y adolescentes sugiere abuso sexual. Cuando se sospecha de esta condición, se debe notificar inmediatamente al médico tratante y a la Comisión Local de Vigilancia Epidemiológica (COLOVE), así como los diferentes servicios sociales encargados de proceder con las acciones legales correspondientes. Remitirse al cuadro 13.5 (3).

Cuadro 13.3. Resumen de agentes etiológicos y muestras clínicas indicadas en infecciones a nivel de tracto genital femenino

Cuadro clínico	Localización de la infección	Patógeno (s) primario (s)	Tipo de muestra
Bartolinitis	Glándula Bartolino	<i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Bacterias entéricas Anaerobios <i>Ureaplasma urealyticum</i>	Aspirado de glándula
Cervicitis	Canal endocervical	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Hisopado endocervical



		<i>Neisseria gonorrhoeae</i> HSV	Hisopado de úlcera para HSV
Úlcera genital con linfadenopatía inguinal	Piel y tejidos blandos del área genital y nódulos linfáticos inguinales	<i>Klebsiella granulomatis</i> <i>C. trachomatis</i> serovares L1, L2, L3. <i>Haemophilus ducreyi</i> <i>Treponema pallidum</i>	Raspado de úlcera Aspirado de nódulo linfático inguinal Suero (para sífilis y LGV)
Endometritis	Tejido endometrial	<i>Actinomyces</i> spp., <i>C. trachomatis</i> , Bacterias entéricas, anaerobios, <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> .	Aspirado transvaginal o biopsia de endometrio
Salpingitis	Trompas de Falopio y cavidad peritoneal	<i>C. trachomatis</i> , Bacterias entéricas, anaerobios, <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i>	Culdocentesis, laparoscopia de trompas de Falopio, absceso pélvico
Skenitis	Glándulas de Skene	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i>	Aspirado de la glándula
Uretritis	Uretra	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i>	Hisopado uretral Orina
Vaginosi	Vagina	<i>Candida</i> spp., <i>Trichomonas vaginalis</i> y vaginosis bacteriana (<i>Gardnerella vaginalis</i> , anaerobios: <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Mobiluncus</i> spp., <i>Prevotella</i> spp.)	Hisopado vaginal
Vulvovaginitis	Vagina y vulva	<i>Candida</i> spp, <i>S. aureus</i>	Hisopado vaginal Hisopado vulvar
Vulvovaginal, úlceras perineales	Vagina, vulva y perineo	HSV	Hisopado de la úlcera para HSV

Cuadro 13.4. Resumen de agentes etiológicos y muestras clínicas indicadas en infecciones a nivel de tracto genital masculino.

Cuadro clínico	Localización de la infección	Patógeno (s) primario (s)	Tipo de muestra
Balanopostitis	Glande y prepucio	Enterobacterias y anaerobios <i>S.pyogenes</i> <i>S.aureus</i>	Hisopado debajo del prepucio
Epididimitis	Epidídimo	<i>C. trachomatis</i> y <i>N. gonorrhoeae</i> Enterobacterales <i>Enterococcus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>M.tuberculosis</i>	Hisopado uretral Orina Tejido epididimal
Orquitis	Testículo	<i>C. trachomatis</i> <i>N.gonorrhoeae</i> Enterobacterales <i>Enterococcus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>M.tuberculosis</i>	Hisopado uretral Orina Tejido testicular
Absceso prostático	Glándula prostática	Enterobacterales <i>Enterococcus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>S. aureus</i>	Aspirado de absceso
Prostatitis	Glándula prostática	Enterobacterales <i>Enterococcus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	Orina Hisopado uretral Líquido prostático
Uretritis	Uretra	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>U. urealyticum</i> , <i>T. vaginalis</i> , HSV	Hisopado uretral

Cuadro 13.5. Implicaciones de infecciones asociadas a abuso o transmisión sexual en niños y adolescentes prepuberales.

Microorganismo	Evidencia de abuso sexual	Acción sugerida
<i>N. gonorrhoeae</i> ¹	Diagnóstico	Reportar ²
<i>T. pallidum</i> ¹	Diagnóstico	Reportar ²
VIH ³	Diagnóstico	Reportar ²
<i>C. trachomatis</i> ¹	Diagnóstico	Reportar ²
<i>T. vaginalis</i> ¹	Diagnóstico	Reportar ²
HSV ano-genital	Sospechoso	Considerar reporte ^{2,4}
Molusco contagioso	No concluyente	Sugerir seguimiento médico
Vaginosis bacteriana	No concluyente	Sugerir seguimiento médico

1. Si es poco probable la transmisión perinatal y se descartó transmisión vertical.
2. Reportar a la COLOVE, médico tratante y responsables de iniciar el proceso de atención social y judicial.
3. Si es poco probable la transmisión perinatal o vía transfusión sanguínea.
4. A menos que exista clara evidencia de autoinoculación.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 134 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

FASE POSANALITICA

Reporte de tinción de Gram

- En hombres, las muestras de secreción uretral con diplococos Gram negativo intracelulares y/o extracelulares son el diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* y deben ser reportados como máximo a las 2 horas de recibida la muestra en el laboratorio. Reporte de la siguiente manera:
 - “Se observa diplococos Gram negativo semejantes a *Neisseria gonorrhoeae*”.**
- En mujeres, reporte la probabilidad de vaginosis bacteriana según los criterios de Nugent, basado en el puntaje indicado en el cuadro respectivo, de la siguiente manera:
 - “Morfotipos consistentes con microbiota vaginal normal”.**
 - “Morfotipos mixtos consistentes con una transición de la microbiota vaginal normal”.**
 - “Morfotipos mixtos consistentes con vaginosis bacteriana”.**
- Si se observa algún otro morfotipo predominante asociado a respuesta inflamatoria, reportar este morfotipo bajo la escala de cruces incluyendo la observación semicuantitativa de PMN, tanto para hombres como mujeres.

Reporte de examen al fresco

- Permite demostrar la presencia de *Trichomonas vaginalis*, estructuras fúngicas, células guía, leucocitos y otros elementos celulares para el diagnóstico de vaginitis o vaginosis bacteriana.
 - “Se observa [indicar hallazgo]”.**

Reporte de hallazgos negativos

- Muestras vaginales, cervicales y uretrales: Si no se aísla patógenos y únicamente hay microbiota normal presente evidenciado por el puntaje 0-3 en el score de Nugent, reporte:
 - “Microbiota normal del tracto genital. No se evidencia microorganismos patógenos”.**
- Si el médico solicitó la búsqueda de un microorganismo en específico y este no se recuperó, reporte:

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 135 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- a. **“No se aisló [nombre del microorganismo]”.**
3. Campo oscuro (cuando no se observa treponemas) reporte:
 - a. **“No se observa espiroquetas semejantes a *Treponema pallidum*”.**
4. Para las pruebas moleculares, reporte cada microorganismo probado como:
 - a. **“No detectado”.**

Reporte de hallazgos positivos

1. Cultivos:
 - a. Reporte el nombre del patógeno identificado.
 - i. **“[ID del microorganismo]”.**
 - b. Para aquellos análisis cuyo criterio Nugent evidenció una vaginosis bacteriana (puntaje 7-10), y en ausencia de patógenos cultivables, reporte:
 - i. **“Cultivo negativo por *Neisseria* y *Candida*. Puntaje según criterio de Nugent sugiere vaginosis bacteriana”.**
2. Campo oscuro:
 - a. Cuando se observa microorganismos que tienen una morfología y motilidad característica de *T. pallidum*, reporte:
 - i. **“Se observa espiroquetas semejantes a *Treponema pallidum*”.**
3. Pruebas moleculares: reporte cada patógeno como:
 - a. **“Detectado”.**

Reporte ID + PSA

- Antes de emitir los informes de resultados, evalúe de forma conjunta los resultados de todas las muestras de un mismo paciente.
- Tenga en cuenta los resultados de la tinción de Gram y su concordancia con los resultados de los cultivos.

REFERENCIAS

1. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818814>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 136 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

2. J. Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., et al. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 67, Issue 6, pp. e1–e94). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
3. American Academy of Pediatrics. (2021). Kimberlin DW, Barnett E.D., Lynfield R., Sawyer M.H., (Eds). Red Book: 2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics. <https://doi.org/10.1542/9781610025782>
4. Rao, S.R., Pindi, K.G., Rani, U., Sasikala, G., & Kawle, V. (2016). Diagnosis of Bacterial Vaginosis: Amsel's Criteria vs Nugent's scoring. *Scholars Journal of Applied Medical Sciences*, 4, 2027-2031. DOI: 10.21276/sjams.2016.4.6.32.

Anexo. Tablas de pruebas diagnósticas para las principales infecciones genitales

Cuadro 13.6 Pruebas diagnósticas y sus respectivas muestras para el análisis de lesiones cutáneas genitales.

Agente etiológico	Pruebas diagnósticas de laboratorio	Muestra recomendada
HSV-1 & 2	NAAT (Ideal para pacientes sintomáticos con lesiones)	Raspado o hisopado del material de la vesícula
	Serología (útil cuando los NAAT dieron negativos, pero hay lesiones)	Suero
Sífilis (<i>T. pallidum</i>)	Microscopía de campo oscuro (debe analizarse de inmediato)	Material/exudado de la úlcera colocado directamente en el portaobjetos
	Ensayos de fluorescencia directa (DFA)	Hisopado del material/exudado de la úlcera (genital, oral, rectal) extendido en un portaobjetos
	Pruebas no treponémicas (VDRL)	Suero
	Pruebas treponémicas serológicas: inmunoensayos enzimáticos (ELISA), ensayos quimioluminiscentes (CLIA) y FTA-ABS (absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes)	Suero
Chancro blando (<i>H. ducreyi</i>)	Tinción de Gram y cultivo	Hisopado del material/ exudado base de la úlcera
	NAAT	Hisopado del material/ exudado base de la úlcera
Granuloma venéreo (<i>C. trachomatis</i>)	Serología: MIF (microinmunofluorescencia) NAAT	Hisopado de la base de la úlcera Suero Hisopado de la base de la úlcera
Granuloma inguinal (<i>K. granulomatis</i>)	Tinción de Giemsa o Wright (se realiza en patología; se observan bacilos azules con gránulos polares prominentes)	Raspados de piel parafinados

Otras lesiones chancriformes (<i>Sporothrix</i> , <i>B. anthracis</i> , <i>F. tularensis</i> , <i>M.ulcerans</i>)	Cultivo dirigido al patógeno específico. Excepto <i>M. ulcerans</i> que requiere NAAT	Raspados de piel
---	---	------------------

Cuadro 13.7. Pruebas diagnósticas para vaginosis bacteriana y vaginitis y sus respectivas muestras.

Agente etiológico	Pruebas diagnósticas de laboratorio	Muestra recomendada
Vulvovaginitis por <i>Candida</i> spp. pH< 4.5	Examen al fresco (solución salina, sensibilidad del 40 – 80 %) Cultivo	Hisopado de secreción vaginal
Vaginosis bacteriana *No se recomienda cultivo pH< 4.5	Examen al fresco en solución salina (buscar células "clue" con ausencia de leucocitos) Tinción de Gram Cuantificada (criterios de Nugent) NAAT	Hisopado de secreción vaginal
<i>T. vaginalis</i> pH> 6.0	NAAT Examen al fresco en solución salina (baja sensibilidad, 40 – 65%) *Procesar dentro de los 30 min	Hisopado vaginal, endocervical, uretral, rectal. También orina y medios de citología líquida. Hisopado de secreción vaginal

Cuadro 13.8. Pruebas diagnósticas para uretritis y cervicitis y sus respectivas muestras.

Agente etiológico	Pruebas diagnósticas de laboratorio	Tipo de muestra ideal
<i>N. gonorrhoeae</i>	Tinción de Gram (solo para hombres) Cultivo NAAT	Hisopados de secreción uretral Hisopado de secreción endocervical, uretral, rectal, orofaríngeo y de conjuntiva. Orina, hisopados (vaginales, endocervicales, uretrales, rectales, faríngeos), y medios de citología líquida
<i>C. trachomatis</i>	NAAT	Orina, hisopados (vaginales, endocervicales, uretrales, rectales, faríngeos), y medios de citología líquida
<i>T. vaginalis</i>	NAAT Examen al fresco en solución salina (baja sensibilidad, 40 – 65%) *Procesar dentro de los 30 min	Hisopado vaginal, endocervical, uretral, rectal. También orinas y medios de citología líquida. Hisopado endocervical o uretral



	Pruebas rápidas de detección de antígenos	Hisopado endocervical
HSV-1 & 2	NAAT (Ideal para pacientes sintomáticos con lesiones)	Raspado o hisopado del material de la vesícula
	Cultivo (raro)	Raspados torunda en medio UTM/VTM
<i>Mycoplasma genitalium</i>	NAAT	Orina, hisopados (endocervicales, uretrales y rectales)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	NAAT	Orina, hisopados (endocervicales, uretrales y rectales)

Módulo 14: Diagnóstico microbiológico de infecciones del sistema respiratorio

FASE PREANALÍTICA

Muestras clínicas, transporte y conservación

Las muestras de tracto respiratorio superior incluyen muestras que se pueden obtener fácilmente como los hisopados (que, por su naturaleza, son fácilmente contaminados con microbiota normal) así como muestras obtenidas por métodos invasivos (aspirados), con las cuales se pueden recuperar microorganismos que pueden ser asociados a un estado portador, como a patologías del tracto respiratorio. De ahí la importancia de jerarquizar con la información disponible, cuáles son los microorganismos de relevancia, en cada muestra analizada. De lo anterior, se deduce el gran valor que tiene la muestra adecuada para proporcionar información valiosa para el diagnóstico microbiológico. Se presenta un listado de muestras recomendadas, según cuadro clínico, tal como lo indica el cuadro 14.1 (1)

Cuadro 14.1 Muestras recomendadas para diagnóstico microbiológico de infecciones en tracto respiratorio

Cuadro clínico	Patógeno primario	Muestra recomendada
Absceso pulmonar	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Anaerobios ²	Aspirado o tejido pulmonar
Bronquitis crónica	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Bacilos Gram negativo	Tracto respiratorio inferior ¹
Cadidiasis oral	<i>Candida albicans</i>	Hisopado de mucosa oral, lengua u orofaringe
Epiglotitis	<i>Haemophilus influenzae</i>	Hemocultivo
Empiema	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Anaerobios ² <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Líquido pleural
Esofagitis	<i>Candida albicans</i>	Biopsia de esófago
Faringitis	Estreptococos del grupo A <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Hisopado faríngeo (No de algodón)
Laringitis, bronquiolitis	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Tracto respiratorio inferior ¹
Neumonía	<u>Asociada a la comunidad:</u> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> Anaerobios (aspiración) ² <i>Pasteurella</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	Tracto respiratorio inferior ¹ <u>Recipiente indicado para recolección:</u> -Frasco estéril de bocha ancha para esputos.



	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia psittaci</i> <i>Nocardia</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i> (VIH)	-Frasco estéril del kit de aspiración y lavados broncoalveolares para otros
	<u>Agentes de bioterrorismo:</u> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Brucella</i> spp., <i>Francisella tularensis</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Burkholderia mallei</i> , <i>Burkholderia pseudomallei</i> .	
	<u>Asociada a la atención de la salud:</u> <i>Staphylococcus aureus</i> Bacilos Gram negativo incluyendo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y otros no fermentadores Anaerobios (aspiración) ²	
	<u>Inmunocomprometidos:</u> Patógenos primarios Bacterias inusuales como <i>Rhodococcus equi</i> <i>Pneumocystis jirovecii</i>	
Otitis externa	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Vibrio</i> spp.	Hisopado del canal auditivo
Otitis media	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Alloicoccus otitidis</i>	Líquido de timpanocentesis
Sinusitis	<u>Aguda:</u> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <u>Crónica:</u> Agentes de sinusitis aguda Bacilos Gram negativo incluyendo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Anaerobios	Aspirado de senos paranasales

1. Tracto respiratorio inferior incluye: Espujo, aspirado endotraqueal, otras muestras de succión, aspirados pulmonares, lavados bronquiales, lavado bronquioalveolar, cepillo protegido, biopsias pulmonares.
2. Cultivo de anaerobios: Se requiere muestras como cepillos protegidos, aspirado de absceso pulmonar, líquido pleural.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 141 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico (agudo/crónico), fecha de inicio de síntomas, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha y hora de recolección, tipo de muestra, sitio anatómico, técnica de obtención.
Muestras clínicas indicadas	
Detalle en cuadro 14.1	
Criterios de rechazo	
-Muestras no rotuladas o con datos incongruentes.	-Muestras derramadas o en las que no se pueda asegurar la esterilidad del recipiente, serán jerarquizadas de acuerdo con la criticidad de las mismas.
-Muestras de hisopados nasales, no recogidos por otorrinolaringólogo, no son aceptables, salvo para estudios específicos (tamizaje de portadores MRSA, estudios por <i>B. pertusis</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i>), según los lineamientos nacionales.	-Estudios diagnósticos de <i>Streptococo</i> grupo A no están indicados en niños menores de 3 años, dado que la fiebre reumática aguda es rara en infantes y niños pequeños, excepto, en casos indicados por otros factores de riesgo.
-Muestras identificadas como "secreción bronquial" no son aceptables para estudios bacteriológicos o micobacteriológicos.	-Los esputos inducidos no son muestras aptas para cultivo por bacterias. Únicamente para estudios por tuberculosis.
-Muestras de esputo o aspirado endotraqueal con recuentos de células epiteliales ≥ 10 (3+) no son aptas para cultivo bacteriano.	-Muestras duplicadas de esputo, aspirado endotraqueal recibidos en el mismo día (excepto si la primera muestra fue reportada inadecuada).
-Muestras de broncoscopia no deben rechazarse dado que son recolectadas por métodos invasivos. Cuando se presenten en tiempo mayor al indicado, o en condiciones no óptimas, el Laboratorio Clínico debe comunicarlo con el médico tratante, informar el compromiso de la muestra y la necesidad de repetir la toma.	
Observaciones	
-En el caso de muestras invasivas (timpanocentesis, aspirado paranasal) sin datos completos o incorrectos, el responsable en el Laboratorio Clínico debe comunicarse con el Servicio Solicitante para la corrección de los datos	-No se debe repetir cultivos en un intervalo menor a cada 48 horas.
-En muestras tomadas con jeringa, se debe transferir el contenido a un tubo o recipiente estéril.	-En las biopsias de tejido. Se pueden recibir con solución salina estéril para mantener la hidratación de la muestra. Se debe agregar la cantidad mínima de SS requerida para recubrir la muestra.
Recipiente indicado para la recolección	
- <u>Espustos, aspirados endotraqueales y lavados bronquioalveolares</u> : Frasco estéril de boca ancha, con cierre hermético, debidamente rotulado	- <u>Aspirados nasales/paranasales</u> : deben recolectarse en un contenedor estéril, hermético para evitar derrames.
- <u>Hisopados faríngeos, muestras de canal auditivo</u> : deben trasladarse en medio de transporte AMIES líquido. - <u>Aspirados de absceso pulmonar y tejidos pulmonares</u> : recipiente estéril de cierre hermético.	- <u>Cepillos protegidos</u> : deben colocarse en recipientes estériles y transportados con 1mL de solución salina estéril, lo más rápido posible al Laboratorio Clínico.
Condiciones de transporte	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en contenedores estériles con cierre hermético que sean apropiados al tamaño y que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad, sin añadir formol ni otros preservantes. -La muestra no debe ser refrigerada ni congelada (2,4). -Las muestras sólidas (tejido o biopsia) se transportan en recipientes estériles de boca ancha (4).	



Caja Costarricense de Seguro Social
Gerencia Médica
Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud

Página **142** de **209**

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA
VERSIÓN 1

CÓDIGO:
MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

FASE ANALÍTICA

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 14.2 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de muestras respiratorias		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ¹
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz Vórtex	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF Incubadora bacteriológica de CO₂ a 37°C
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Agar Haemophilus¹ (HAE) Agar Manitol Sal (MSA) Agar MacConkey (MCK)	Asas bacteriológicas de 1µL y 10µL Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Pinzas Micropipeta automática de 100 µL y puntas estériles Buffer de fosfato estéril	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción Gram Técnicas moleculares¹ Discos de Optochin Discos de Bacitracina

1. Según disponibilidad del centro

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico: Tracto Respiratorio Superior

1. Verifique la rotulación de la muestra respiratoria, valide que la información corresponda en la solicitud.
2. Verifique el tipo de muestra, según se indica en la solicitud: hisopado (otitis externa) o líquido de timpanocentesis, aspirado de senos paranasales.

3. En muestras óticas y en aspirado de senos paranasales se debe realizar un extendido para la tinción de Gram. **No se debe realizar tinción de Gram en muestras de hisopado faríngeo (1).**
4. Tal como lo indican Leber y Meseguer (1)(2), se deben usar criterios para evaluar la calidad de la muestra según la cantidad de células epiteliales escamosas y leucocitos observados en la tinción de Gram, tal como se indica en el cuadro 14.3 (1).
5. Siembra de medios de cultivo:
 - a. Muestras para estudios de otitis externa y media: inocule las muestras usando asa estéril, en ACH, COS y MCK, la siembra debe realizarse por dispersión/agotamiento en los cuadrantes con el fin de aislar las colonias.
 - b. Muestras de aspirado nasal: inocule en ACH y COS, la siembra debe realizarse por dispersión/agotamiento en los cuadrantes con el fin de aislar las colonias.
 - c. Muestras de hisopado faríngeo: inocule en COS, la siembra debe realizarse por dispersión/agotamiento en los cuadrantes con el fin de aislar las colonias. También se recomienda realizar muescas/cortes en el agar.
6. Incube los medios de cultivo a 35 – 37° C, por un mínimo de 48 horas en capnofilia. Para los aislamientos de muestras faríngeas, se incuba a 35 – 37° C por un mínimo de 48 horas en aerobiosis.
7. En el caso de muestras invasivas (timpanocentesis y aspirado paranasal), debe reincubar los cultivos hasta por 7 días, si los resultados son negativos. Para cultivos por bacterias anaerobias, seguir las instrucciones que correspondan en el módulo 18.

Cuadro 14.3 Criterios para evaluación de la tinción de Gram en muestras de tracto respiratorio inferior y superior.

Leucocitos y células epiteliales (10X), 20 - 40 campos observados		
No se observa	0	No se observa
Escasos	<1	1+
Pocos	1-9	2+
Muchos	10-25	3+
Abundantes	>25	4+
Microorganismos (100X)		
No se observan	0	No se observa

Escasos	<1	1+
Pocos	1-5	2+
Muchos	6-30	3+
Abundantes	>30	4+

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico: Tracto Respiratorio Inferior

La muestra dependerá de la clínica del paciente, estado ventilatorio, análisis a ejecutar entre otros factores. Sin embargo, dada la metodología de cultivo, es indispensable conocer con exactitud el tipo de muestra, por lo que solicitudes y muestras que indiquen únicamente secreción bronquial, no deben ser procesadas.

Espujo y aspirado endotraqueal:

1. Verifique la rotulación de la muestra respiratoria, valide que la información corresponda al de la solicitud.
2. Verifique el tipo de muestra, según se indica en la solicitud: esputo, aspirado endotraqueal, entre otros.
3. Realice el extendido para la tinción de Gram, a partir de las áreas más purulentas/sanguinolentas de la muestra. En el caso de broncoscopías (lavado bronquial o bronquialveolar) se debe preparar la muestra en citocentrífuga.
4. Evalúe la calidad de la muestra mediante tinción de Gram según se indica en el cuadro 14.3 (1).
5. En cabina de bioseguridad utilice un aplicador o asa estéril para inocular los medios de cultivo y posteriormente realizar la siembra por dispersión/agotamiento en los cuadrantes con el fin de aislar las colonias en las siguientes placas: COS, MCK, MSA, ACH y HAE.
6. Coloque un disco de bacitracina en la segunda zona de ACH (para mejorar el aislamiento de *H. influenzae* en caso de no contar con medio HAE) y disco de optochin en la segunda zona de COS (para mejorar el aislamiento de *S. pneumoniae* (opcional)). Para ello esterilice una pinza utilizando alcohol de 70° y una lámpara de alcohol.
7. Incube como sigue:
 - a. ACH, COS y HAE a 35-37°C en capnofilia durante un mínimo de 48 horas (idealmente cultivar hasta 72 horas).

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 146 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

b. MCK y MSA 35-37°C en aerobiosis durante un mínimo de 48 horas.

Broncoscopías (1-2):

1. Verifique el tipo de muestra, según se indica en la solicitud: broncoscopía con o sin broncoscopio que incluye lavado bronquioalveolar, lavado bronquial, cepillo protegido, biopsia transbronquial.
2. Realice el extendido y prepare la muestra con centrifugación para la tinción de Gram. Valore la calidad de las muestras tal como se indica en el cuadro 14.3.
3. Siembra por método cuantitativo: utilice medios de cultivo ricos como ACH y COS.

a. Método de pipeta:

- i. Se requiere hacer la siembra desde 2 hasta 4 diluciones de acuerdo al tipo de muestra.

1. Dilución x10 (Cepillo protegido): Transfiera 100 µL de la muestra a las placas (ACH y COS) con micropipeta y punta estéril (rotular x10, cada colonia equivale a 10 UFC/mL).
2. Dilución x100 (Cepillo protegido y BAL): Transfiera 10 µL de la muestra con micropipeta y punta estéril a placas de ACH y COS (rotular x100, cada colonia equivale a 100 UFC/mL)
3. Dilución x1000 (Opcional en cepillo protegido y requerido en BAL): Transfiera 50 µL de la muestra con micropipeta y punta estéril en un tubo con 5 mL de buffer fosfatos y agite en equipo vórtex. Transfiera 100 µL a cada placa de ACH y COS (rotular x10³, cada colonia equivale a 10³ UFC/mL)
4. Dilución x10⁵ (BAL): Transfiera 50 µL de la muestra con micropipeta y punta estéril de la dilución indicada en el punto iii., en un tubo con 5 mL de buffer fosfatos y agite en equipo vórtex. Transfiera 100 µL a una placa de ACH y otra de COS (rotular x10⁵, cada colonia equivale a 10⁵ UFC/mL)

- ii. Extienda de manera uniforme por toda la placa, comenzando por la más diluida a la menos diluida, realizando rayados a lo largo de la placa en tres direcciones.
- iii. Inocule los medios MCK, MSA y HAE por dispersión/agotamiento en los cuadrantes con el fin de aislar las colonias, estos medios no requieren diluciones.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 147 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

iv. Incube como sigue:

1. ACH, COS y HAE a 35-37°C en capnofilia durante un mínimo de 48 horas (idealmente cultivar hasta 72 horas).
2. MCK y MSA 35-37°C en aerobiosis durante un mínimo de 48 horas.

b. Método de diluciones seriadas: Cepillo protegido

- i. Agite vigorosamente en vórtex por 30 – 60 segundos.
- ii. Coloque 100 µL con micropipeta y puta estéril de la muestra, en las placas de ACH y COS (rotular x10, cada colonia equivale a 10 UFC/mL).
- iii. Utilice un asa calibrada de 10 µL y coloque esta cantidad en cada placa de ACH y COS (rotular x100, cada colonia equivale a 100 UFC/mL)
- iv. Extienda de manera uniforme por toda la placa, comenzando por la más diluida a la menos diluida, realizando rayados a lo largo de la placa, en todas direcciones.
- v. Incube a 35 – 37°C utilizando una incubadora con CO₂ a 35°C, durante un mínimo de 48 horas.
- vi. Incubar durante un mínimo de 48 horas.
- vii. Realice la siembra por dispersión/agotamiento en cuadrantes con el fin de aislar las colonias en los medios de cultivo diferenciales tales como MCK y MSA. Incubar a 35 – 37° C en aire ambiente durante un mínimo de 48 horas

c. Método de diluciones seriadas: Lavado bronquioalveolar

- i. Agite vigorosamente en vórtex por 30 – 60 segundos.
- ii. Con asa calibrada, colocar 10 µL en los medios de cultivo COS, ACH (rotular x100, cada colonia equivale a 100 UFC/mL)
- iii. Con asa calibrada colocar 1 µL en cada placa de COS y ACH (rotular x1000, cada colonia equivale a 1000 UFC/mL)
- iv. Esparcir de manera uniforme por toda la placa, comenzando por la más diluida a la menos diluida.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 148 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

v. Realice la siembra por dispersión/agotamiento en cuadrantes con el fin de aislar las colonias en los medios de cultivo diferenciales tales como MCK y MSA.

vi. Incube como sigue:

1. ACH, COS y HAE a 35-37°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante un mínimo de 48 horas (idealmente cultivar hasta 72 horas).
2. MCK y MSA 35-37°C en atmósfera de aerobiosis durante un mínimo de 48 horas.

vii. Concentrar por centrifugación para cultivos por hongos, micobacterias

A continuación, se presenta a manera de ejemplo, un diagrama del método de siembra cuantitativo, con micropipeta, descrito en el punto iii., modificado del Manual de Procedimientos del Laboratorio Clínico del Hospital Nacional de Niños (Figura 14.1) (5), elaborado por el Dr. Cristian Perez:

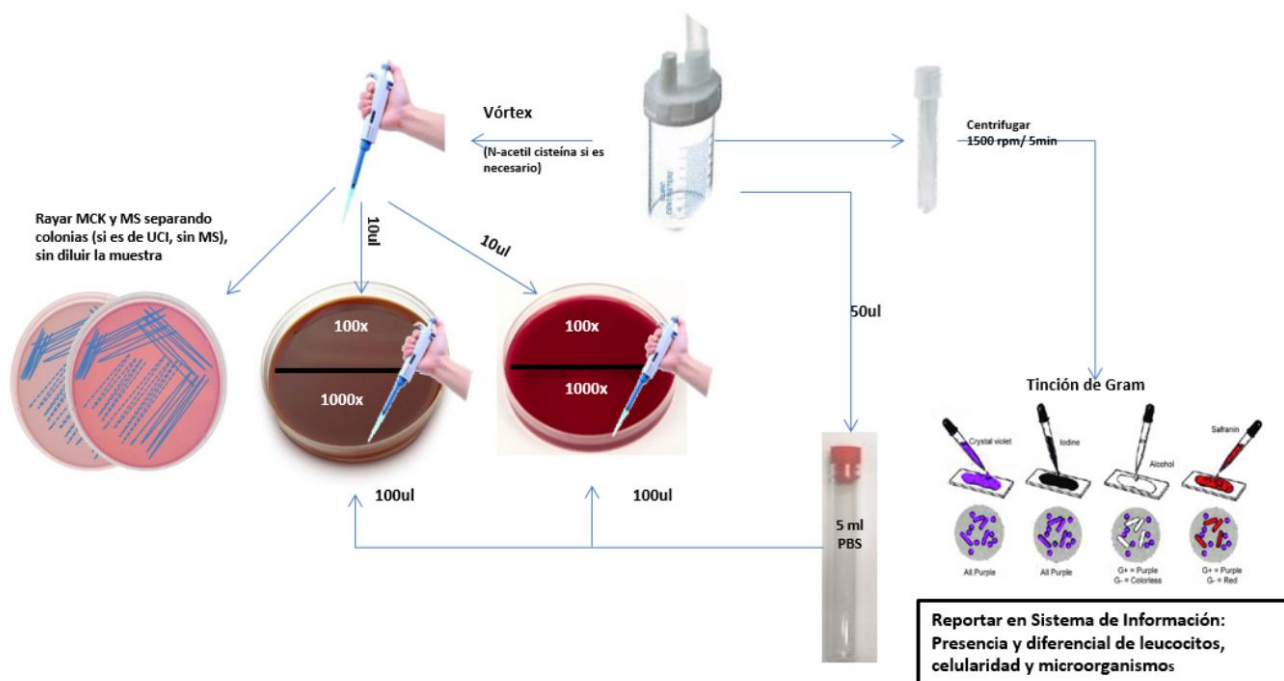


Figura 14.1 Esquema de trabajo de siembra cuantitativa de muestras respiratorias

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 149 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Análisis e interpretación de cultivos de tracto respiratorio (1-3)

Otitis externa:

1. Revise las placas a las 24 y 48 horas para valorar crecimiento por *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio* spp.. Se considera responsable un solo microorganismo; por lo tanto, debe buscarse activamente estos agentes, si se recuperan en un contexto polimicrobiano de cultivo.
2. Identifique cultivos puros de bacilos Gram negativo, cocos Gram positivo, así como levaduras. *Aspergillus* y *Candida albicans* están implicados en infecciones crónicas.
3. No reporte microbiota normal de la piel (corinebacterias así como SOSA).

Otitis media:

1. Revise las placas cada 24 horas hasta por 5 días (en muestras invasivas).
2. Identifique todos los microorganismos que estén creciendo en cultivo puro.
3. Cultivos mixtos de SOSA, *Streptococcus* grupo viridans y corinebacterias pueden representar microbiota normal de la piel.
4. Identifique patógenos tales como:
 - a. *Haemophilus influenzae* (realizar prueba de betalactamasa) y *M. catarrhalis*
 - b. *Nocardia* (infecciones crónicas)
 - c. *Alloiococcus otitidis*
5. Identifique y realice PSA
 - d. *Streptococcus pyogenes* y Estreptococos beta hemolíticos.
 - e. *Streptococcus pneumoniae*
6. Microbiota normal de la piel (corinebacterias y SOSA) deben trabajarse únicamente si están puros o crecen en gran cantidad. Se debe reportar *Turicella otitidis*, generalmente asociada a otitis media.

Aspirado paranasal:

1. Revise las placas por crecimiento de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *S. pyogenes*.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 150 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

2. Revise las placas a las 24 y a las 48 horas, para verificar crecimiento de Bacilos Gram negativo y de *S. aureus*. Estos organismos son usuales contaminantes y no deben identificarse, excepto, en caso de crecimiento predominante.
3. Realice la PSA en caso de que el crecimiento en placas correlacione con la respuesta inflamatoria observada en la tinción de Gram.
4. Identifique cualquier microorganismo predominante que no sea parte del microbiota normal respiratoria.
5. Realice identificación de anaerobios en caso de la solicitud médica. Refiérase al módulo 19 de cultivo anaerobio para mayor detalle.

Hisopados faríngeos:

1. Revise las placas a las 24 y a las 48 horas, en busca de colonias translúcidas/transparentes, rodeadas de zona de hemólisis completa (beta-hemólisis) sugestivas de *Streptococcus pyogenes*.
2. Realice la prueba de catalasa. En caso negativo, realice identificación por metodología disponible (sistema automatizado).

Tracto respiratorio inferior:

1. En el caso de cultivos de esputos, aspirados traqueales y endotraqueales, anote el crecimiento observado en las placas. Valore en cruces de la siguiente manera:
 - a. Crecimiento en la primera zona: escaso crecimiento, interpretado como 1+ (+).
 - b. Crecimiento en la segunda zona: valorar si hay crecimiento de pocas o muchas colonias, interprete como 2+ (++)
 - c. Crecimiento en tercera y cuarta zona: valorar si hay crecimiento abundante e interpretar como 3+ y 4+ (+++,++++)

NOTA: El recuento semicuantitativo en escala de cruces es requerido para realizar la jerarquización en muestras de tracto respiratorio inferior. No es necesario reportarlo en el informe final de resultados.

2. Realice ID y PSA de acuerdo con los estándares vigentes de CLSI a los morfotipos que representen aislamientos clínicamente significativos. Para este fin, valore cada morfotipo colonial presente, su significancia (cuadro 14.4) y su recuento semicuantitativo, con la guía de interpretación detallada en la figura 14.2 (1).
3. En lavados bronquio alveolares y cepillo protegido, se debe reportar según recuento, multiplicando el total de colonias en la placa por el factor de dilución correspondiente.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 151 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Cuadro 14.4 Guía de reporte de patógenos primarios en tracto respiratorio inferior

Reportar	Microorganismos
Siempre	1. <i>Streptococcus pyogenes</i> 2. <i>Streptococcus</i> grupo B en muestras pediátricas 3. <i>Francisella tularensis</i>¹ 4. <i>Bordetella</i> spp., en especial <i>B. bronchiseptica</i> 5. <i>Yersinia pestis</i> 6. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 7. <i>Nocardia</i> 8. <i>Bacillus anthracis</i> 9. <i>Cryptococcus neoformans</i> 10. Hongos filamentosos no deben considerarse contaminantes saprofitos. En muestras de esputo y aspirado endotraqueal se recomienda solicitar segunda muestra y jerarquizar según hallazgos.
Bajos recuentos si se observaron en la tinción Gram	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> (reportar como mínimo la betalactamasa)
Con recuento $>10^3$ en cepillo protegido o en $>10^4$ lavado bronquioalveolar. Valorar según respuesta inflamatoria observada en la tinción Gram.	1. <i>Moraxella catarrhalis</i> 2. <i>Neisseria meningitidis</i> En pacientes hospitalizados, reportar con PSA: 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 5. <i>Acinetobacter</i> 6. <i>Burkholderia</i>
Con recuento $>10^3$ en cepillo protegido o en $>10^4$ lavado bronquioalveolar, y si el crecimiento es predominante en el cultivo. Valorar según respuesta inflamatoria observada en la tinción Gram.	1. <i>Staphylococcus aureus</i> (reportar PSA) 2. <i>Streptococcus</i> beta hemolítico en adultos 3. Un solo morfotipo de bacilo Gram negativo (especialmente <i>Klebsiella pneumoniae</i>), reportar PSA 4. Bacilos Gram negativo fastidiosos (reportar betalactamasa) 5. <i>Corynebacterium</i> si el paciente procede de una Unidad de Cuidado Intensivo (UCI) 6. <i>Rhodococcus equi</i> en paciente inmunocomprometido
Realizar ID y PSA de bacilos Gram negativo	Cuando crece un morfotipo en muestras de esputo y aspirado endotraqueal Cuando crecen máximo dos morfotipos en muestras de lavado bronquioalveolar/cepillo protegido.

¹ En caso de identificar *F. tularensis*, confirme que no se trate de otro microorganismo como *Campylobacter* spp. Los sistemas automatizados basados en la realización de pruebas bioquímicas, suelen tener limitaciones para la identificación este patógeno. En caso de tener colonias sugestivas, se debe referir al centro de referencia para su correspondiente identificación.



Aislamiento(s) consistentes con microorganismos encontrados en el tracto respiratorio superior. Si <i>Enterococcus</i> y SOSA, son los únicos presentes (con/sin levaduras), reportar: Microorganismos Gram positivo mixtos	<i>Streptococcus</i> grupo viridans <i>Neisseria</i> no patogénica Difteroides SOSA <i>Rothia</i> <i>Streptococcus</i> grupo F Anaerobios <i>Haemophilus</i> no <i>H. influenzae</i> <i>Eikenella</i> <i>Actinobacillus</i> <i>Capnocytophaga</i> <i>Moraxella</i> <i>Enterococcus</i> Levaduras <i>S. aureus</i> en bajo recuento
---	---

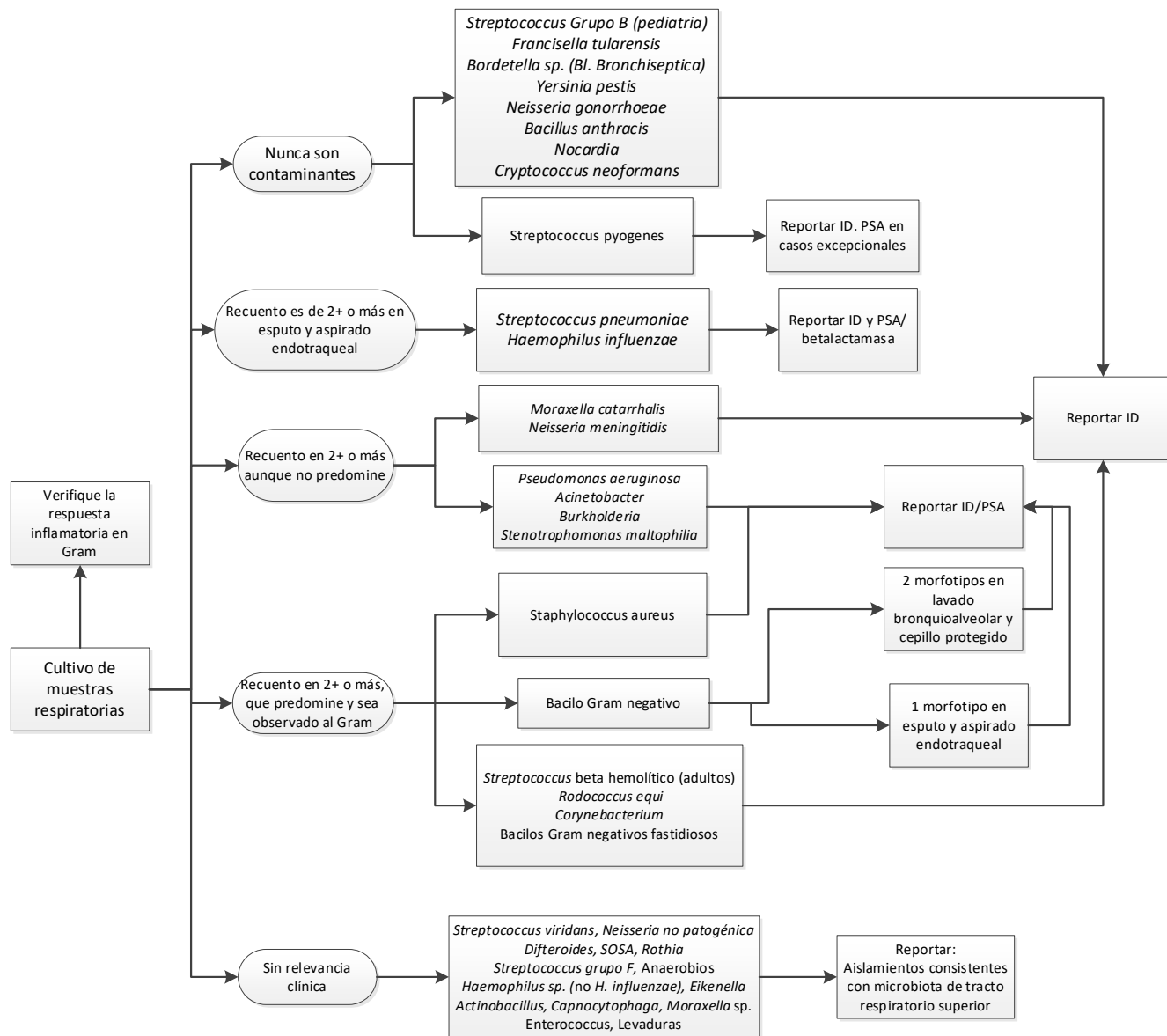


Figura 14.2 Guía de reporte de patógenos en esputos y aspirados endotraqueales para el diagnóstico de infección de tracto respiratorio inferior.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 154 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

POSANALÍTICA

Reporte de resultados: cultivo de muestras de tracto respiratorio superior

Reporte de resultados negativos

1. En muestras invasivas, sin crecimiento de microorganismos patógenos, indique el número de días de incubación de los cultivos.
2. En el caso de observar microorganismos en el Gram, pero no observar crecimiento en placas, extienda el tiempo de incubación e incluya una nota respecto a la discrepancia.
3. En hisopado faríngeo negativo por SGA, reporte:
 - a. **“Negativo por Streptococo del grupo A”.**
4. En el caso de cultivos mixtos sin un microorganismo predominante, indique según lo observado. Por ejemplo:
 - a. **“Cultivó morfotipos mixtos consistente con microbiota normal de la piel”.**
5. Indique la presencia de microbiota de la piel sin identificación.

Reporte de resultados positivos

1. Reporte identificación y PSA de patógenos.
 - a. **[ID del microorganismo] y PSA (si corresponde) de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

2. En caso de aislamientos por *Vibrio* spp., reporte y verifique con la historia clínica y enviar al Centro Nacional de Referencia en Bacteriología.
3. En hisopado faríngeo con aislamiento de SGA, reporte:
 - a. **“Positivo por Streptococo del grupo A”.**

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 155 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Reporte de resultados: cultivo de muestra de tracto respiratorio Inferior

Reporte de resultados negativos

1. Crecimiento de microbiota de tracto respiratorio superior o cultivo negativo sin observación de bacterias al Gram, reporte:
 - a. **“Cultivo negativo por microorganismos patógenos”.**
2. En muestras de esputo y aspirado endotraqueal, con celularidad adecuada y presencia de bacterias al Gram, sin obtener crecimiento alguno, reporte:
 - a. **“No se obtuvo crecimiento de microbiota normal (inhibida). Se sugiere enviar nueva muestra”.**
3. Crecimiento de múltiples morfotipos coloniales de acuerdo a la jerarquización (No valorable el cultivo partiendo de muestra de buena calidad al Gram), reporte:
 - a. **“Crecimiento polimicrobiano con múltiples morfotipos, lo cual limita la interpretación. Se sugiere repetir recolección de muestra”.**
4. Muestra de mala calidad definida por los criterios de Gram, reporte:
 - a. **“Tinción de Gram evidencia ≥ 10 células epiteliales escamosas por campo, sugestivo de pobre calidad de la muestra. Se sugiere recolectar nueva muestra según indicación clínica”.**

Reporte de resultados positivos

1. Reporte la identificación y PSA cuando corresponda.
 - a. **[ID del microorganismo] y PSA (si corresponde) de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI**

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.
2. Reporte el recuento en el caso de broncoscopías. Si excede el límite de la dilución, reporte:
 - a. **“Recuento mayor a [concentración más alta de las diluciones] UFC/mL”.**

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 156 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

REFERENCIAS

1. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical microbiology procedures handbook (4a ed.). American Society for Microbiology.
2. Antonia Meseguer, M., Begoña Cacho, J., Oliver, A., & de la Bellacasa, J. P. (2008). Diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas del tracto respiratorio inferior. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 26(7), 430–436. <https://doi.org/10.1157/13125641>
3. Braun J, S. (2003). Estudio microbiológico del tracto respiratorio superior. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 20(3), 193–198. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182003000300007>
4. Díez, Ó., Batista, N., Bordes, A., Lecuona, M., & Lara, M. (2007). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 25(6), 387–393. <https://doi.org/10.1157/13106964>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 157 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 15: Diagnóstico microbiológico de infecciones oculares

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Las infecciones oculares se definen por las estructuras anatómicas que se ven afectadas. Pueden afectar a las estructuras superficiales que rodean el ojo (conjuntivitis, blefaritis, canaliculitis, dacriocistitis, celulitis orbitaria y periorbitaria), a la superficie ocular (queratitis) o a los líquidos y tejidos intraoculares (endofalmitis y uveítis) (1).

Las infecciones oculares superficiales generalmente son causadas por bacterias que colonizan la piel, mientras que las infecciones oculares internas pueden involucrar una amplia variedad de organismos, incluidas bacterias, hongos, parásitos y virus (2).

Las recomendaciones para el diagnóstico de laboratorio de infecciones oculares a menudo se basan en estudios en los que solo se examinó un pequeño número de muestras clínicas, por lo que la base de evidencia para muchas recomendaciones es limitada (4).

Muestras clínicas indicadas

Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano y la aplicación de anestésicos tópicos y colorantes vitales, siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitan. Si ya se han utilizado, se deben eliminar por lavado con agua o solución salina estéril no bacteriostática, antes de efectuar la toma de la muestra porque estas sustancias pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos. Se recomienda que la recolección de las muestras oculares, excepto los exudados conjuntivales, la realice un oftalmólogo con las máximas condiciones de asepsia y evitando la contaminación con la microbiota comensal y ambiental (1).

Datos del paciente: Nombre completo, número de identificación.

Datos de la muestra: Fecha y hora de la toma de muestra. Cuadro clínico. Sitio anatómico de recolección de la muestra (ej. conjuntiva, córnea, etc)

Indique el ojo muestreado, especialmente en aquellos pacientes que presentan infección bilateral, debido a que las etiologías pueden diferir entre los ojos (2,4).

Otras consideraciones:

- Una muestra recolectada por técnica invasiva siempre debe estar acompañada por una muestra de hisopo con medio de transporte tomado de la conjuntiva.

Cuadro 15.1 Descripción de los tipos de muestra clínica recolectada en infecciones oculares superficiales (1,2,4)

Cuadro clínico	Descripción de la infección	Tipo de muestra recolectada
Conjuntivitis	Inflamación aguda y crónica de la conjuntiva, la membrana mucosa que cubre la esclerótica	Hisopado de superficie de conjuntiva/pus, utilizando hisopo estéril en medio de transporte AMIES previamente humedecido con solución salina o medio de cultivo líquido (Con el que cuente el laboratorio) Es la única muestra de tipo ocular que puede recolectar el personal asignado de laboratorio
Celulitis preseptal	Inflamación de los tejidos blandos periorbitarios	Cultivo de heridas superficiales o abscesos utilizando aguja y jeringa (aspiración) Hemocultivos (según cuadro clínico y criterio médico)
Dacrioadenitis/ dacriocistitis	Dacrioadenitis: Infección de las glándulas lagrimales. Dacriocistitis: Infección del saco lagrimal.	Cultivos de heridas superficiales del conducto lagrimal externo o pus utilizando hisopo estéril en medio de transporte AMIES
Canaliculitis	Inflamación del canaliculo, el conducto que conecta el punto lagrimal con el saco lagrimal (es una extensión de la dacrioadenitis y dacriocistitis)	Cultivos de heridas superficiales del conducto lagrimal externo o pus utilizando una aguja y jeringa (aspiración) o hisopo estéril en medio de transporte AMIES

Cuadro 15.2 Descripción de los tipos de muestra clínica recolectada en infecciones oculares internas (1,2,4)

Cuadro clínico	Descripción de la infección	Tipo de muestra recolectada
Queratitis bacteriana	Inflamación aguda y crónica de la córnea	Raspados corneales o biopsia de córnea
Endoftalmitis bacteriana	Inflamación de las cavidades oculares y del tejido intraocular (úvea y retina)	Humor acuoso y vítreo, recolectado por aspiración y depositado en un contenedor estéril (tubo o jeringa)
Celulitis orbital	Infección de los tejidos orbitarios más profundos que puede extenderse al espacio retroorbitario y al cerebro, lo que resulta en trombosis del seno cavernoso y/u otra infección intracraneal	Cultivo de heridas superficiales utilizando una aguja y jeringa (aspiración) o hisopo estéril en medio de transporte AMIES Hemocultivos (según cuadro clínico y criterio médico) Aspirados de senos paranasales

- En casos de sospecha de conjuntivitis unilateral, se indica la recolección de cultivo bilateral de forma obligatoria. Se debe indicar claramente cual es el ojo afectado.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 159 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Cuando el transporte de las placas inoculadas se retrase notifique al médico que el cultivo puede estar comprometido o contaminado.
- Las muestras de exudados y abscesos obtenidas con hisopos se deben enviar en medio de transporte AMIES líquido.
- Las jeringas utilizadas para la toma de los aspirados pueden emplearse como medio de transporte, eliminando el aire en una gasa impregnada con alcohol. En este caso siempre se debe enviar sin aguja y con un capuchón estéril (1-2).

Criterios de rechazo:

- Muestras sin identificar o en las que los datos no coincidan con la solicitud.
- Muestras derramadas.
- Muestras recolectadas en recipientes no estériles ni las conservadas en formol u otros aditivos.
- Muestras enviadas sin medio de transporte.
- Muestras enviadas en hisopo de algodón.

Sin embargo, las muestras intraoculares y corneales son de difícil obtención por los riesgos que conlleva su extracción para el paciente, y en muchas ocasiones son insustituibles, por lo que los criterios de rechazo, deben reducirse al máximo. El personal del laboratorio antes de rechazar la muestra está en obligación de llamar al servicio y consultar con el clínico responsable de la solicitud (1).

Transporte y conservación de muestras

El transporte de muestras oculares al Laboratorio Clínico debe ser inmediato a temperatura ambiente (2).

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras oculares

- Para que el rendimiento de las pruebas diagnósticas microbiológicas en las muestras oculares sea óptimo, es esencial una buena colaboración entre el laboratorio de microbiología y el oftalmólogo.
- El microbiólogo clínico debe tener un conocimiento básico de la anatomía del ojo y la terminología utilizada por los oftalmólogos para describir las infecciones oculares y sus síntomas y signos clínicos.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 160 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Los oftalmólogos por su parte deben conocer procedimientos microbiológicos básicos para seleccionar la muestra adecuada, inocular e identificar correctamente los medios de cultivo con precisión, transportar la muestra, o los medios inoculados, sin demora al laboratorio.
- Debido a las pequeñas cantidades de muestra que se pueden recolectar del ojo, es importante que en algunas situaciones el médico inocule los medios de cultivo al momento de la recolección, en lugar de transportar la muestra al laboratorio para su procesamiento (1,2).

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 15.3 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de muestras oculares		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ¹
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C Microscopio de luz	Sistema automatizado para ID Y PSA	Sistema MALDI-TOF Incubadora bacteriológica de CO2 a 37°C
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Chocolate (ACH) Agar Thayer - Martin (ATM) Agar Manitol Sal (MSA) Agar MacConkey (MCK) Agar Sabouraud+Gentamicina² (SABG) Medio líquido de enriquecimiento³	Asas bacteriológicas de 1µL y 10µL Sistema generador de atmósfera de capnofilia Portaobjetos Alcohol de 70% Hisopo estéril en medio de transporte AMIES⁴	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina Reactivos para tinción Gram Técnicas moleculares¹ Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis¹ Medios de cultivo de enriquecimiento, selectivos y diferenciales para bacterias anaerobias¹

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 161 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

1. Según disponibilidad del centro
2. Según indicación médica. Si es indispensable en muestras corneales
3. Si bien los medios líquidos tienen características de rendimiento específicas, es aceptable el empleo de **Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC)**, **Tioglicolato (TIO)** o **Caldo Tripticasa Soya (CTS)**.
4. Exclusivo para la toma de muestras.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

1. Si los medios de cultivo no fueron inoculados por el médico. Seleccione los medios a sembrar según el cuadro clínico del paciente y el tipo de estudio solicitado. Si se solicita estudio por *N. gonorrhoeae* debe utilizar el medio ATM. También se pueden solicitar estudios por hongos y/o micobacterias
2. Inocule la muestra en cada medio de cultivo (COS, ACH y MCK), luego con el asa estéril raye por dispersión/agotamiento en cuatro zonas.
3. En caso de recibir un pequeño volumen de muestra de líquido intraocular en una jeringa, use el medio líquido de enriquecimiento para lavar la jeringa extrayendo una pequeña cantidad de caldo. Utilice el caldo para inocular cada medio sólido con 2 gotas y raye por dispersión/agotamiento. Luego coloque la muestra diluida restante en el medio líquido.
4. Realice el frotis para la tinción de Gram.
5. Incube las placas de COS, ACH y el caldo (en caso de inoculación) en incubadora de CO₂ y la placa de MCK en incubadora convencional, ambas a 35-37°C.
6. En el caso de estudios corneales (raspados o biopsias) o sospecha clínica por hongos en otros cuadros clínicos siembre en SABG, y realice los procedimientos indicados en el manual de procedimientos de micología.
7. Si está realizando estudio por anaerobios, siembre en los medios para anaerobios e incube las placas y el medio líquido de enriquecimiento en la incubadora de anaerobiosis, sino cuenta con cámara de anaerobiosis utilice técnicas para generar el ambiente e incube. Para mayor detalle refiérase al módulo 19 de cultivo por anaerobios.

NOTA: Otra forma de inocular las muestras oculares, principalmente en los raspados corneales por queratitis, es el rayado en C. En la figura 15.1 se presenta el diagrama y demostración del proceso (3).

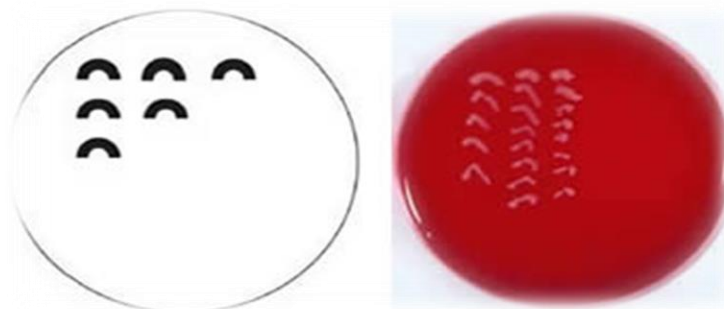


Figura 15.1. Representación de un rayado en “C” para el cultivo en medio sólido de muestras oculares.

Análisis e interpretación tinción de Gram y cultivos

Cuadro 15.4. Interpretación de tinción de Gram en muestras corneales e intracorneales (1)

Cantidad de polimorfonucleares (PMN)/campo con objetivo 10X	Interpretación
≤1	No se observan PMN
1-4	Escasos PMN
1-10	Moderados PMN
>10	Abundantes PMN

1. Examine todas las placas y el medio líquido (en caso de utilizarse) en busca de evidencia de crecimiento a las 24 horas. Si no se observa un crecimiento visible en los medios de cultivo, vuelva a incubar.
2. Lea diariamente las placas por al menos 2 días más, hasta un máximo de 7 días, dependiendo de la sospecha clínica.
3. Estime e informe la cantidad de cada morfortipo observado en las distintas placas, en UFC. La presencia del mismo morfortipo colonial en varios medios de cultivo es un indicador de la etiología bacteriana de la infección (2).

Interpretación del rayado en “C” (2):

1. 1+: menos de la mitad de las ‘C’ son positivas (crecimiento bacteriano) por placa.
2. 2+: Más de la mitad de las ‘C’, pero no todas, son positivas.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 163 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

3. 3+: Todos los rayados en 'C' son positivas para bacterias.

4. Los cuadros 15.5 (1,2,4) y 15.6 (1,2,4,5) resumen los patógenos más frecuentes en infecciones oculares. Así como la interpretación del cultivo en casos específicos.

Cuadro 15.5 Microorganismos más frecuentes según cuadro clínico en infecciones oculares.

Cuadro clínico	Patógenos primarios	Patógenos menos frecuentes	Posibles contaminantes
Conjuntivitis	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Moraxella</i> spp. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Enterobacterales <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (en pacientes hospitalizados y/o inmunocomprometido)	SOSA <i>Corynebacterium</i> spp Estreptococos grupo viridans <i>Cutibacterium acnes</i> Difteroides Usualmente se consideran microbiota normal, excepto si se aíslan de pacientes con previa cirugía por cataratas o cirugía LASIK
Celulitis preseptal	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Haemophilus influenzae</i> (común en niños) <i>Moraxella</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Anaerobios: <i>Bacteroides</i> spp. y <i>Peptostreptococcus</i> spp (probable si la infección es secundaria a traumas) <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Mucor</i> spp. (pacientes inmunodeprimidos)	SOSA <i>Corynebacterium</i> spp Estreptococos grupo viridans <i>Cutibacterium acnes</i> Difteroides
Dacrioadenitis Dacriocistitis Canaliculitis	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Actinomyces</i> spp. (especialmente en niños y en infecciones crónicas)	<i>Candida</i> spp.	SOSA <i>Corynebacterium</i> spp Estreptococos grupo viridans <i>Cutibacterium acnes</i> Difteroides Su relevancia clínica se determinará según su crecimiento en los cultivos, la tinción de Gram y del contexto clínico



Queratitis bacteriana	Trauma corneal/úlceras <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Estreptococos del grupo viridans <i>Moraxella</i> spp. <i>Nocardia</i> spp.	Asociado al uso de lentes de contacto <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia</i> spp. Enterobacterales <i>Bacillus</i> spp. <i>Acanthamoeba</i> spp. Micobacterias de crecimiento rápido	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Haemophilus influenzae</i>	SOSA <i>Corynebacterium</i> spp Estreptococos grupo viridans <i>Cutibacterium acnes</i> Difteroides Un crecimiento escaso (menos de 10 UFC) en un medio sólido o solo en medio líquido se puede considerar una contaminación.
Endoftalmitis bacteriana	Post quirúrgico/post traumático <i>Staphylococcus aureus</i> SOSA (podría ser contaminante también, debe evaluarse a fondo) Estreptococos del grupo viridans <i>Bacillus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Cutibacterium acnes</i> Anaerobios, incluye <i>Clostridium</i> spp.	Secundaria a bacteriemia (siembra) <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacterales	<i>Nocardia</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . <i>Scedosporium</i> spp. <i>Sporotrichum</i> spp. <i>Mucor</i> spp.	SOSA <i>Corynebacterium</i> spp Estreptococos viridans <i>Cutibacterium acnes</i> Difteroides Su relevancia clínica se determinará según su crecimiento en los cultivos, la tinción de Gram y del contexto clínico
Celulitis orbital	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacterales <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>		<i>Aspergillus</i> spp. y <i>Mucor</i> spp. (pacientes inmunodeprimidos)	SOSA <i>Corynebacterium</i> spp Estreptococos viridans <i>Cutibacterium acnes</i> Difteroides Su relevancia clínica se determinará según su crecimiento en los

	Anaerobios		cultivos, la tinción de Gram y del contexto clínico
--	------------	--	---

Cuadro 15.6. Otras interpretaciones de crecimiento bacteriano en cultivo de muestras oculares.

Hallazgo	Criterio de interpretación
Muestras de humor acuoso y vítreo	Todos los organismos cultivados en cualquier cantidad a partir de muestras oculares críticas, es decir invasivas deben identificarse e informarse los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. En caso de aislarse un microorganismo considerado microbiota normal de la piel, lea el apartado destinado a este grupo.
En todas las muestras oculares (criterios de diagnóstico)	El crecimiento de microorganismos se considera significativo si se cumple cualquiera de las siguientes condiciones. Si el crecimiento es confluyente (más de 10 UFC) en los medios sólidos inoculados. Si el organismo visto en las placas es compatible con lo observado en la tinción de Gram. Si el mismo organismo se aisló a partir de más de un medio de cultivo.
Presencia de microbiota normal de piel en cualquier muestra ocular SOSA <i>Corynebacterium</i> spp Estreptococos grupo viridans <i>Cutibacterium acnes</i>. Difteroides <i>Peptostreptococcus</i> spp.	Deber ser considerado patógeno si crece en más de un medio, con una tinción de Gram compatible con el microorganismo aislado y el análisis clínico del paciente. Los pacientes inmunodeprimidos con queratitis o pacientes post cirugía de cataratas o cirugía LASIK presentan mayor riesgo, y principalmente en las muestras recolectadas de manera invasiva. Si, por el contrario no se cumplen esas condiciones, es altamente probable que el microorganismo aislado se trate de un contaminante. Se recomienda comunicarse siempre con el médico antes de reportar colonias de microbiota normal, especialmente si se aíslan a partir de muestras recolectadas de forma no invasivas

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados negativos

- Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos u líquidos incubados en aerobiosis, reporte:
 - “Cultivo negativo por microorganismos aerobios”.**
- Si no se observa crecimiento en los medios de cultivo sólidos u líquidos incubados en aerobiosis y anaerobiosis, reporte:

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 166 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

a. “Cultivo negativo por microorganismos aerobios y anaerobios”.

3. Si se observa la presencia de un posible contaminante de acuerdo con los criterios establecidos, reporte:

a. [Identificación del microorganismo]. “Microorganismo se considera generalmente contaminante, valorar bajo contexto clínico del paciente”.

Reporte de resultados positivos

1. Cultivo con microorganismo de significancia clínica en infecciones oculares, reporte:

a. ID y PSA de acuerdo a los estándares vigentes de la CLSI.

La interpretación del antibiograma de microorganismos poco frecuentes o con puntos de corte no definidos, pueden consultarse en otras guías como EUCAST.

REFERENCIAS

1. Díaz-López, M.D., García-Garrote, F., Perales-Palacios I., Pescador-Martín, P. (2019). Procedimientos en Microbiología Clínica: Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC): 31 a.
2. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical microbiology procedures Handbook. AMS Press. <https://doi.org/10.1128/97815558188146>
3. Leck, A. (2009). Taking a corneal scrape and making a diagnosis. Comm Eye Health, 22 (71),42 - 43.
4. Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., Gonzalez, M. D., Jerris, R. C., Kehl, S. C., Patel, R., Pritt, B. S., Richter, S. S., Robinson-Dunn, B., Schwartzman, J. D., Snyder, J. W., Telford, S., III, Theel, E. S., Thomson, R. B., Jr, Weinstein, M. P., & Yao, J. D. (2018). A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. In Clinical Infectious Diseases (Vol.67, Issue 6, pp. e1-e94). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/cid/ciy381>
5. Sharma S. (2012). Diagnosis of infectious diseases of the eye. Eye, 26(2), 177–184. <https://doi.org/10.1038/eye.2011.275>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 167 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 16: Diagnóstico microbiológico de infección por *Clostridioides difficile*

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Clostridioides difficile es la primera causa de diarrea hospitalaria en países desarrollados y una etiología cada vez más frecuente de diarrea comunitaria. La irrupción de la cepa hipervirulenta de *C. difficile* NAP1/BI/027 en Canadá a principios de este siglo, y su rápida propagación al resto de países ha contribuido al aumento de la morbilidad y mortalidad de la infección por *C. difficile* (ICD) (1).

Las cepas de *C. difficile* toxigénicas (CDT) poseen un locus de patogenicidad (PaLoc) con los genes codificantes de las toxinas A y B (tcdA y tcdB), exotoxinas que principalmente causan la sintomatología de la ICD. Se ha descrito también una toxina binaria, cuyo rol en la patogénesis de *C. difficile* no es claro (2). Este cuadro clínico puede cursar desde diarrea leve o moderada, a colitis pseudomembranosa fulminante y muerte.

Las principales manifestaciones clínicas de ICD son las siguientes (3):

- Diarreas severas acuosas no sanguinolentas.
- Diarreas persistentes o recurrentes sin causa conocida, específicamente 3 deposiciones o más en un período de 24 horas.
- Diarrea con presencia de colitis, fiebre, dolor abdominal en los cuadrantes inferiores del abdomen.
- Diarrea con leucocitosis y aumento en los niveles de creatinina sérica.
- Dolor abdominal severo, diarrea profusa y megacolon tóxico.
- Colitis pseudomembranosa demostrada por endoscopia.

En torno al 1-3% de la población general y el 20% de los pacientes hospitalizados son portadores sanos de cepas CDT. Además, el 50% de los niños menores de 2 años pueden ser portadores asintomáticos de este patógeno (4); en pacientes con fibrosis quística se ha demostrado que las tasas de colonización alcanzan hasta 32%. Por tanto, la realización de pruebas diagnósticas debe limitarse a pacientes con cuadro clínico evidente y diarrea.

Los factores de riesgo asociados a ICD han sido revisados por múltiples grupos de investigación, con actualizaciones constantes. En la Tabla 16.1 se presenta el consolidado de los factores predisponentes para ICD propuestos por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA), Colegio Americano de Patólogos y Sociedad Española de Microbiología (2-6,8).

Tabla 16.1. Factores de riesgo para desarrollar infecciones por *C. difficile*.

Clasificación	Factores de riesgo
Farmacológicos	Uso de antibióticos de amplio espectro, principalmente Clindamicina, fluoroquinolonas, cefalosporinas, penicilinas y macrólidos
	Uso de inhibidores de la bomba de protones
	Uso de antagonistas de receptores de histamina
	Uso de antiinflamatorios no esteroideos
	Uso de aspirina y corticoesteroides
Relacionados al hospedero	Mayor de 65 años
	Género femenino
	Enfermedades crónicas: Enfermedad renal crónica, Diabetes Mellitus
	Malignidades: Leucemias, linfomas, cáncer
	Previa infección con CDT
	Síndrome de intestino irritable
Relacionados a la atención en salud	Alimentación por sonda
	Hospitalización prolongada
	Ingreso a Unidad de Cuidado Intensivo
	Historial de cirugías y procedimientos gastrointestinales no quirúrgicos
	Colonización con <i>Enterococcus</i> Vancomicina-resistente
	Proximidad con paciente positivo por ICD

Las infecciones adquiridas en la comunidad constituyen en torno al 25% del total de casos de ICD, y se dan en pacientes sin los factores de riesgo tradicionales, ya que suele afectar a individuos jóvenes y sin tratamiento antibiótico previo (2). Por tanto, la evidencia actual sugiere descartar CDT en todo paciente con diarrea persistente, aunque no presente factores de riesgo atribuibles a ICD (5). Esta práctica busca abordar el importante infra diagnóstico que tiene la enfermedad (2). Por tanto, se sugiere el procesamiento de CDT a toda muestra de heces diarreica (con excepción de niños menores de 2 años), la interpretación de los resultados, abordaje clínico y tratamiento está supeditado a la disponibilidad de servicios de Gastroenterología, Medicina Interna, Infectología, entre otros.

En cuanto al análisis de muestras de heces seriadas, todas las fuentes consultadas coinciden en recomendar la recolección de una sola muestra de heces durante el curso de un mismo episodio de ICD, siendo que la detección rutinaria de múltiples muestras apenas aumenta el rendimiento y puede generar falsos positivos.

Por su parte, no se recomienda la detección de *C. difficile* para la confirmación de la curación post-tratamiento de ICD, pues no tiene correlación con la resolución de los síntomas (6). Por tanto, se han de rechazar las muestras de heces pertenecientes a todo paciente diagnosticado microbiológicamente de ICD en los 7 días previos (2).

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 169 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, edad. Posible diagnóstico, cuadro clínico o factor de riesgo. Terapia antimicrobiana recibida.
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma. Servicio que envía la muestra
Muestras clínicas indicadas	
-Muestra de heces diarreicas, 5mL.	-Muestra de heces formadas solo en pacientes con íleon paralítico o megacolon tóxico.
-Muestras de heces formadas en el estudio de CDT en potenciales donantes para trasplante fecal (9).	-Hisopados rectales para prueba de PCR en pacientes con íleon paralítico o megacolon tóxico.
-Contenido intestinal.	
Criterios de rechazo (2-6).	
-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la solicitud	-Muestras a temperatura ambiente que fueron recolectadas hace más de 2 horas.
-Muestras de heces no diarreicas. Excepciones: Heces sólidas con diagnóstico de megacolon tóxico o íleo paralítico	-Más de una muestra de heces por episodio de diarrea atribuible a ICD
-Solicitud de prueba para ICD como control de tratamiento	-Muestra de heces en pacientes con detección en los 7 días previos
-Hisopados rectales para diagnóstico sin asociación a las características indicadas anteriormente	-Muestras de niños menores a 1 año de edad. No se realiza bajo ningún contexto clínico.
-Muestras en niños de 1 a 2 años, salvo el razonamiento calificado de haber descartado otras causas infecciosas y no infecciosas.	-Muestras de pacientes con fibrosis quística. -Muestras tomadas en pacientes asintomáticos para estudios de portadores.
Observaciones	
-Definición operativa de muestra diarreica: La muestra debe tomar la forma del recipiente que la contiene.	-El estudio de CDT se realiza en pacientes hospitalizados y ambulatorios. Los últimos bajo coordinación local.
-Ante una prueba negativa y la persistencia de síntomas, se puede repetir en 72 horas.	-No es recomendable utilizar estas pruebas para seguimiento de la infección.
Recipiente indicado para la recolección	
-Se toma la muestra en contenedor limpio, a prueba de fugas con una tapa hermética. Se prefiere frasco estéril destinado para muestras de heces	
Condiciones de transporte	
-No se requiere ningún medio de transporte ni preservante. -Se debe transportar la muestra de inmediato al laboratorio, con o sin hielo dependiendo las indicaciones del fabricante de las pruebas. Si no es posible, mantener en refrigeración por un máximo de 24 horas. Las toxinas se degradan rápidamente a temperatura ambiente, llevando a resultados incoherentes entre GDH y toxinas. -Si la muestra se someterá a la detección de otros enteropatógenos, es aconsejable su conservación en medio Cary Blair líquido. -En el Laboratorio Clínico se debe conservar entre 2-8°C hasta su procesamiento.	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 170 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales del estudio por *C. difficile* toxigénico

- Los autores referenciados sugieren criterios para realizar el diagnóstico de ICD. De los siguientes criterios, se requiere cumplir al menos uno de los dos elementos del criterio a y b, respectivamente, para establecer el diagnóstico. Por su parte, el punto c es un hallazgo suficiente para establecer ICD.
 - a) Uno de los criterios:
 1. Detección de toxinas A/B y/o aislamiento de *C. difficile* toxígeno en ausencia de otras causas atribuibles a diarrea.
 2. Evidencia colonoscópica o histopatológica de colitis pseudomembranosa
 - b) Uno de los criterios:
 1. Presencia de diarrea.
 2. Evidencia de íleo paralítico o megacolon tóxico
 - c) Evidencia de colitis pseudomembranosa por endoscopia.
- En este contexto, el Laboratorio de Microbiología, en coordinación con la COLOVE, debe establecer el algoritmo adecuado para la detección de CDT. Las características físicas de la muestra, presencia de leucocitos y eritrocitos, así como los factores de riesgo del paciente, son determinantes para la selección de la técnica diagnóstica apropiada, interpretación y reporte de resultados.
- Las metodologías más sensibles para detección de *C. difficile* toxigénico son el ensayo de citotoxicidad en cultivo celular y cultivo de CDT (considerado actualmente el estándar de oro). Sin embargo, no son prácticas para la rutina del Laboratorio Clínico; por tanto, se reservan para laboratorios de referencia e investigación que realicen estudios epidemiológicos y validaciones de otros métodos (2-6).
- La detección de *C. difficile* toxigénico se realiza en los Laboratorios Clínicos principalmente con técnicas inmunocromatográficas (IC) basadas en flujo lateral y PCR, siendo la detección de toxinas A/B, asociado a la presencia de *C. difficile* el objetivo de las pruebas. Las primeras son accesibles para la mayoría de centros de salud; por su parte, las segundas requieren de una plataforma instalada de diagnóstico molecular (2-6).
- La selección de la prueba IC para estudio de ICD debe basarse en aspectos técnicos y analíticos. La detección aislada de toxinas A/B tiene alta especificidad, pero baja sensibilidad en el contexto de ICD (40-60%). Por consiguiente, la prueba debe incluir la detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), proteína producida en forma constitutiva y en grandes cantidades por la mayoría de cepas de *C. difficile*. La detección de forma simultánea de GDH y toxinas A/B alcanza sensibilidad clínica alrededor del 90% (7).

- Los ensayos moleculares que detectan CDT suelen tener sensibilidad clínica superior al 90%, tanto para métodos que utilizan PCR en tiempo real, como los que realizan amplificación isotérmica. Por su parte, la especificidad suele alcanzar el 94-99%.
- En la actualidad no existe ninguna técnica diagnóstica costo-efectiva que permita la detección de ICD en todos los contextos; por tanto, los Laboratorios Clínicos deben combinar pruebas IC y PCR mediante la implementación de procesos secuenciales, en orden para garantizar alta sensibilidad y especificidad (3). En la figura 16.1 se detalla los algoritmos diagnósticos desarrollados por la Sociedad Española de Microbiología Clínica para este fin (2).

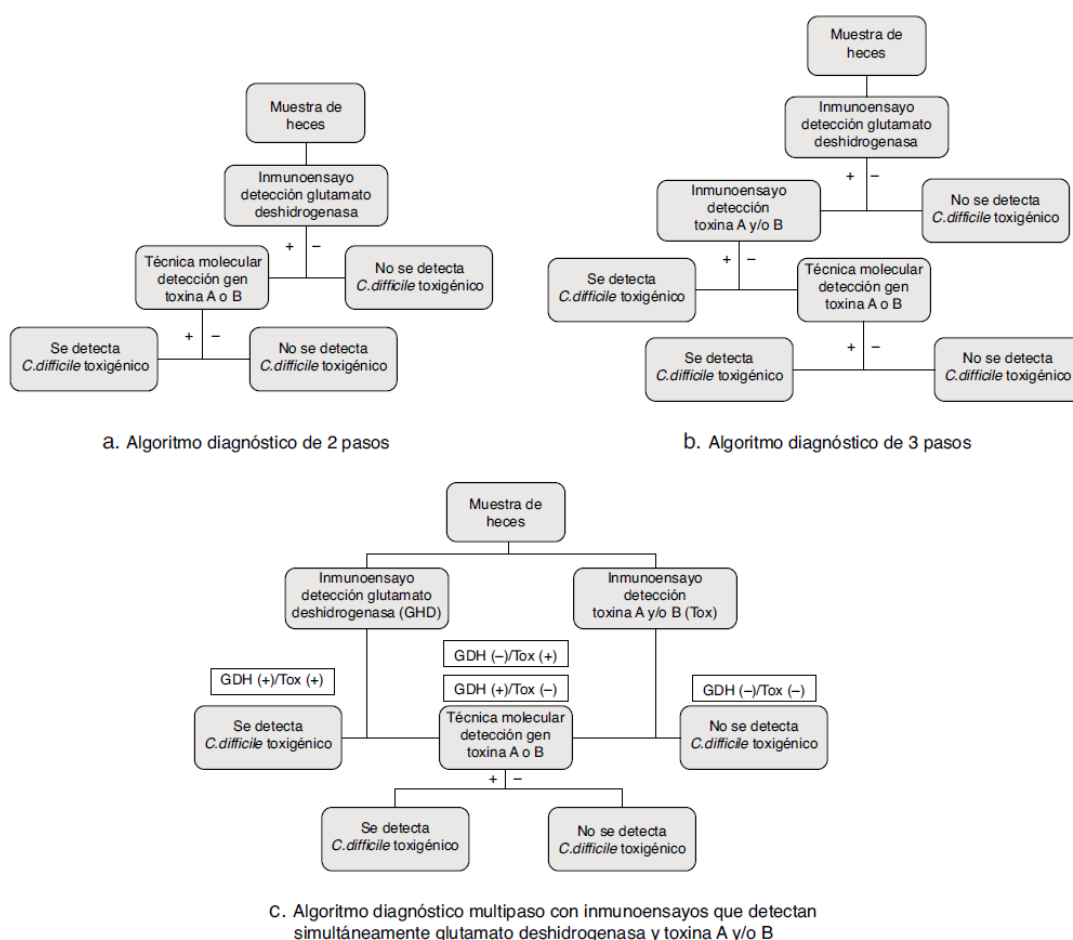


Figura 16.1 Algoritmos diagnósticos de la infección por *Clostridioides difficile*. Para efectos del presente manual, se utilizará los algoritmos b o c.

- Se recomienda trabajar la detección de CDT mediante el algoritmo diagnóstico multipaso (Figura 16.1.c). Para su implementación se requiere pruebas IC que detecten la enzima GDH + toxinas A/B y pruebas de PCR. De esta forma se obtiene una sensibilidad global cercana al 90% dada por la prueba GDH, y especificidad global cercana al 99% dada por el PCR.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 172 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- La marcha analítica de la estrategia multi-paso se basa en la realización inicial de IC y confirmación por PCR ante los siguientes escenarios: 1) GDH (+) Toxinas A/B (-) y GDH (-) Toxinas A/B (+). De esta forma, la prueba IC funge como tamizaje por su bajo costo y el PCR se limita a confirmaciones. Es importante notar que, los costos de la detección de CDT en los laboratorios clínicos deben incluir ambas pruebas, y no analizarse de forma independiente.
- En aquellos centros que no cuenten con pruebas de PCR, se recomienda revisar rigurosamente la sensibilidad de la IC en la detección de toxinas A/B. Ante el escenario de sensibilidad menor al 95%, si se obtiene el resultado GDH (+) Toxinas A/B (-) y el caso corresponde con alta sospecha clínica de ICD; primeramente, se justifica solicitar una nueva muestra y corroborar el resultado. Si este persiste, se debe remitir la muestra a centro de referencia para el complemento de PCR. De igual forma, se debe referir si se obtiene GDH (-) y Toxinas A/B (+) en el mismo contexto de alta sospecha de ICD.
- Es importante considerar que los niveles de toxinas pueden ser bajos, por lo que resultados negativos no descartan ICD, incluso si se emplean pruebas moleculares.
- Por otra parte, las pruebas IC para detección de *C. difficile* toxigénico pueden verse interferidas por presencia de leucocitos y/o eritrocitos, especialmente si la muestra es sanguinolenta valorada macroscópicamente. Estos elementos celulares son inherentes a los pacientes con ICD; por tanto, se recomienda seleccionar la marca de pruebas que ofrezca el mejor manejo de esta variable preanalítica. Así como confirmar por PCR los resultados positivos obtenidos por pruebas con esta limitación.
- Las pruebas de PCR disponibles en el mercado, incluyen la detección de toxinas A (enterotoxina) y B (citotoxina), así como el regulador de toxina C y toxina binaria. Dado que la toxina B es el principal factor de patogenicidad de *C. difficile*, y que, en una proporción significativa de las cepas patógenas la toxina A está ausente, las principales técnicas diagnósticas de PCR se basan en la detección de la toxina B, cuya presencia prevalece en CDT. Dado que la toxina binaria tiene un papel discutido en la patogenicidad de la ICD, su detección como método diagnóstico único no está recomendada. Puesto que las toxinas A y B están codificadas por genes incluidos en un mismo locus de patogenicidad, el cual también incluye el gen regulador negativo *tcdC*, las alteraciones en este gen suelen dar lugar a la hiperproducción de las toxinas con el consiguiente aumento del poder patógeno de la cepa en cuestión (SEIMC, 2015).
- En materia de PCR por *C. difficile* toxigénico, es importante considerar el valor agregado que ofrece la detección del ribotipo 027. Las infecciones producidas por cepas de *C. difficile* del ribotipo 027 suelen ser más graves, transmisibles y recurrentes que las producidas por otros ribotipos. Por consiguiente, se recomienda establecer una especial vigilancia para detectarlas y, así, optimizar su tratamiento y

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 173 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

evitar la diseminación de este clon en el ambiente hospitalario. Por tanto, en instituciones en las que exista una sospecha de alto riesgo de brote (casos aislados detectados recientemente, existencia de alguna institución cercana en situación epidémica, etc.) o en el seno de un brote por este ribotipo, es muy recomendable, siempre y cuando sea posible, modificar el algoritmo diagnóstico multi paso, para realizar la prueba en todos los pacientes hospitalizados con GDH (+), independiente del resultado de toxinas A/B por IC.

- En Costa Rica se han presentado brotes por CDT del ribotipo NAP1/B1/027, con importantes implicaciones en el HSJD entre mayo y agosto del 2009 (Monge et al, 2011). Por lo que, su detección en las pruebas moleculares se justifica.
- Lo discutido anteriormente demuestra el alto nivel de complejidad en el diagnóstico de ICD. Por tanto, se sugiere conformar un protocolo en conjunto con el componente médico, laboratorio y Comité Local de Vigilancia Epidemiológica. De forma que se cada variable expuesta, en orden para establecer las pruebas de CDT pertinentes para el centro.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 16.1 Equipos e insumos requeridos para realizar estudios de <i>C. difficile</i>		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ¹
Cámara de bioseguridad Microscopio de luz Vórtex	No requiere	No requiere
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias ¹
No requiere	Pruebas Inmunocromatográficas para <i>C. difficile</i> (GDH, toxinas A y B) Micropipeta de 100-1000 µL Aplicadores estériles Solución salina estéril (SSE) Lugol Portaobjetos Cubreobjetos	Técnicas moleculares PCR para detección <i>C. difficile</i> (Toxinas A y B)

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 174 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

--	--	--

1. Según disponibilidad del centro.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico

1. Trabaje en cámara de bioseguridad.
2. Realice una preparación al fresco entre portaobjetos y cubreobjetos para observar leucocitos y eritrocitos. Si la muestra de heces ha sido refrigerada, la morfología de estos elementos puede alterarse.
 - a. En caso de observar gran cantidad de leucocitos y/o eritrocitos, verificar la validez de la prueba IC de acuerdo con las especificaciones técnicas. No proceder a realizar la determinación si la interferencia es significativa.
 - b. En caso de no observar leucocitos y/o eritrocitos, proceda con el punto 3.
3. Realice la prueba IC para *C. difficile* que incluya la detección simultánea o paralela de la enzima GDH, toxina A y toxina B. Remitirse a las especificaciones del ensayo para instrucciones del proceso.
4. Proceda con el apartado de interpretación de resultados para técnicas IC.
5. Si corresponde de acuerdo con la interpretación de la prueba IC, realice PCR para la detección de las toxinas A y B de *C. difficile*. Remitirse a las especificaciones del ensayo para instrucciones del proceso.
6. Proceda con el apartado de interpretación de resultados para PCR.
7. Interprete de forma integral los resultados de ambas pruebas para emitir el resultado final.

Análisis e interpretación de resultados en pruebas para estudio de ICD

1) Técnicas inmunocromatográficas

En la tabla 16.2 se presenta el esquema general de interpretación para pruebas IC. Es importante considerar que, algunas casas comerciales no definen escenarios con requerimiento de análisis complementarios. Sin embargo, en los escenarios 6-8 se prefiere la confirmación por PCR fundamentado ampliamente en el apartado de “Consideraciones generales del estudio por *C. difficile* toxigénico”

Tabla 16.2. Interpretación general de resultados obtenidos con pruebas inmunocromatográficas para detección de *Clostridioides difficile* toxigénico.

No.	(GDH)	(Toxina A)	(Toxina B)	Interpretación de los resultados
1	-	-	-	No están presentes GDH, toxina A ni toxina B. No se detecta la presencia de <i>C. difficile</i> .
2	+	+	+	Están presentes GDH, toxina A y toxina B. Hay una infección causada por <i>C. difficile</i> .
3	+	+	-	Están presentes GDH y toxina A. Hay una infección causada por <i>C. difficile</i> .
4	+	-	+	Están presentes GDH y toxina B. Hay una infección causada por <i>C. difficile</i> .
5	+	-	-	Está presente GDH. Hay una probable infección causada por <i>C. difficile</i> . Confirmar toxinas por métodos moleculares.
6	-	+	+	Se debe repetir la prueba utilizando una muestra fresca. Si el resultado persiste se debe proceder a PCR de acuerdo al algoritmo multi paso.
7	-	+	-	Se debe repetir la prueba utilizando una muestra fresca. Si el resultado persiste se debe proceder a PCR de acuerdo al algoritmo multi paso.
8	-	-	+	Se debe repetir la prueba utilizando una muestra fresca. Si el resultado persiste se debe proceder a PCR de acuerdo al algoritmo multi paso.
9	Cualquier resultado sin señal detectada en la banda control			Se considera inválido. Se recomienda repetir el ensayo utilizando la misma muestra con una nueva prueba.

2) Técnicas de PCR

En la tabla 16.3 se presenta el esquema general de interpretación para pruebas de PCR para *C. difficile* toxigénico. Es necesario remitirse a las especificaciones técnicas del fabricante de la plataforma diagnóstica instalada; se debe evaluar rigurosamente los límites de detección, sensibilidad y especificidad en contraparte con la prueba IC utilizada en el paso 1, para efectos de interpretación definitiva del resultado.

Tabla 16.3 Interpretación general de resultados obtenidos por PCR en la detección de *Clostridioides difficile* toxigénico.

Interpretación	Resultado de parámetros de la técnica PCR
POSITIVO por <i>C. difficile</i> toxigénico	-Secuencias de ADN de <i>C. difficile</i> toxigénico fueron detectadas (Toxinas A/B) -Secuencias de ADN de <i>C. difficile</i> fueron detectadas -Las secuencias encontradas tienen CT dentro del rango válido. -No es necesaria la amplificación del control interno de muestra ya que hay amplificación de <i>C. difficile</i> . -Todos los controles de las sondas fueron aprobados.
NEGATIVO por <i>C. difficile</i> toxigénico	-No se detectaron secuencias propias del ADN de <i>C. difficile</i> , ni de sus toxinas. -El control interno de muestra se aprobó con un CT válido para la determinación. -Todos los controles de las sondas fueron aprobados.
INDETERMINADO por <i>C. difficile</i> toxigénico	-Secuencias de ADN de <i>C. difficile</i> toxigénico fueron encontradas, pero no en cantidad suficiente para indicar resultados positivos; por tanto, el resultado a pesar de indicarse Negativo, se debe reportar como Indeterminado.
INVÁLIDO	<u>-La presencia o ausencia de secuencias de <i>C. difficile</i> toxigénico no se puede determinar debido a:</u> 1) Falla en control interno. 2) El CT del control interno de muestra no se encuentra dentro de los rangos válidos.
ERROR	<u>-La presencia o ausencia de secuencias de <i>C. difficile</i> toxigénico no se puede determinar debido a:</u> 1) Uno o más de los controles de las sondas fallaron. 2) El cartucho se preparó incorrectamente. 3) Hubo aumentos en la presión dentro del equipo.
SIN RESULTADO	<u>La presencia o ausencia de secuencias de <i>C. difficile</i> toxigénico no se puede determinar debido a:</u> 1) El operador detiene el resultado sin que el ensayo haya concluido.

3) Interpretación final por integración de técnicas IC y PCR

1. Negativo por *C. difficile*

Inmunocromatografía por <i>C. difficile</i>	GDH: Negativo	PCR por <i>C. difficile</i> toxigénico	No aplica su realización
	Toxina A: Negativo		
	Toxina B: Negativo		

2. Estado portador de *C. difficile* no toxigénico

Inmunocromatografía por <i>C. difficile</i>	GDH: Positivo	PCR por <i>C. difficile</i> toxigénico	Toxina B: Negativo
	Toxina A: Negativo		TcdC: Negativo
	Toxina B: Negativo		Toxina Binaria: Negativo NAP1: Presuntivo negativo

3. Positivo por *C. difficile* toxigénico

Inmunocromatografía por <i>C. difficile</i>	GDH: Negativo	PCR por <i>C. difficile</i> toxigénico	Toxina B: Positivo
	Toxina A: Negativo		TcdC: Positivo
	Toxina B: Positivo		Toxina Binaria: Negativo NAP1: Presuntivo negativo

Inmunocromatografía por <i>C. difficile</i>	GDH: Positivo	PCR por <i>C. difficile</i> toxigénico	Realizar según las posibilidades del Laboratorio para vigilar la circulación del ripo tipo NAP1
	Toxina A: Positivo		
	Toxina B: Positivo		

4. Positivo por *C. difficile* toxigénico hipervirulento.

Inmunocromatografía por <i>C. difficile</i>	GDH: Positivo	PCR por <i>C. difficile</i> toxigénico	Toxina B: Positivo
	Toxina A: Negativo		TcdC: Negativo
	Toxina B: Negativo		Toxina Binaria: Positivo NAP1: Presuntivo positivo

Inmunocromatografía por <i>C. difficile</i>	GDH: Positivo	PCR por <i>C. difficile</i> toxigénico	Toxina B: Positivo
	Toxina A: Positivo		TcdC: Negativo
	Toxina B: Positivo		Toxina Binaria: Positivo NAP1: Presuntivo positivo

5. Positivo por *C. difficile* toxigénico. No se detecta expresión de las toxinas, lo que puede responder a menor sensibilidad de la prueba inmunocromatográfica; o bien, presencia de material genético no asociado a la producción de toxinas. Se sugiere valorar el resultado con el contexto clínico del paciente.

Inmunocromatografía por <i>C. difficile</i>	GDH: Positivo	PCR por <i>C. difficile</i> toxigénico	Toxina B: Positivo
	Toxina A: Negativo		TcdC: Positivo
	Toxina B: Negativo		Toxina Binaria: Negativo NAP1: Presuntivo negativo

6. Detección de material genético de CDT sin el hallazgo fenotípico de toxinas. El hallazgo puede representar trazas de ADN. Se recomienda envío de nueva muestra.

Inmunocromatografía por <i>C. difficile</i>	GDH: Negativo	PCR por <i>C. difficile</i> toxigénico	Toxina B: Negativo
	Toxina A: Negativo		TcdC: Negativo
	Toxina B: Negativo		Toxina Binaria: Negativo NAP1: Presuntivo negativo

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 178 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

FASE POSANALÍTICA

Reporte de resultados

El reporte debe incluir la interpretación conjunta de IC y PCR, adicional al reporte de cada prueba. Estos deben ser evaluados de forma integral, siendo que es posible obtener resultados concluyentes con solo IC; o bien, requerirse de ambas técnicas para un resultado final.

Emita los siguientes reportes de interpretación final:

1. **“Negativo por *C. difficile*”.**
2. **“Estado portador de *C. difficile* no toxigénico, no requiere medidas de aislamiento ni tratamiento para ICD. Se debe valorar otras etiológicas que justifiquen el cuadro diarreico”.**
3. **“Positivo por *C. difficile* toxigénico, se requieren medidas de aislamiento tipo contacto”.**
4. **“Positivo por *C. difficile* toxigénico hipervirulento. se requieren medidas de aislamiento tipo contacto”.**
5. **“Positivo por *C. difficile* toxigénico. No se detecta expresión de las toxinas, lo que puede responder a menor sensibilidad de la prueba inmunocromatográfica; o bien, presencia de material genético no asociado a la producción de toxinas. Se sugiere valorar el resultado con el contexto clínico del paciente”.**
6. **“Detección de material genético de CDT sin el hallazgo fenotípico de toxinas. El hallazgo puede representar trazas de ADN. Se recomienda envío de nueva muestra”.**

En caso de detección de *C. difficile* toxigénico hipervirulento, se debe informar de urgencia al comité local de vigilancia de epidemiológica (COLOVE).

REFERENCIAS

1. Gerding, D. N. (2009). Clostridium difficile 30 years on: what has, or has not, changed and why? In International Journal of Antimicrobial Agents (Vol. 33, pp. S2–S8). Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(09\)70008-1](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(09)70008-1)
2. Alcalá-Hernández, L., Mena-Ribas, A., Niubó-Bosh, J., & Marín-Arriaza, M. (2016). Diagnóstico microbiológico de la infección por Clostridium difficile. In Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (Vol. 34, Issue 9, pp. 595–602). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.09.004>
3. Kelly, C. R., Fischer, M., Allegretti, J. R., LaPlante, K., Stewart, D. B., Limketkai, B. N., & Stollman, N. H. (2021). ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and Treatment of Clostridioides difficile Infections.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 179 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

In American Journal of Gastroenterology (Vol. 116, Issue 6, pp. 1124–1147). Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001278>

4. Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., McDonald, L. C., Pepin, J., & Wilcox, M. H. (2010). Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). In Infection Control & Hospital Epidemiology (Vol. 31, Issue 05, pp. 431–455). Cambridge University Press (CUP). <https://doi.org/10.1086/651706>
5. Leber, A. L. (Ed.4). (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818814>
6. McDonald, L. C., Gerding, D. N., Johnson, S., Bakken, J. S., Carroll, K. C., Coffin, S. E., Dubberke, E. R., Garey, K. W., Gould, C. V., Kelly, C., Loo, V., Shaklee Sammons, J., Sandora, T. J., & Wilcox, M. H. (2018). Clinical Practice Guidelines for Clostridium difficile Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). En Clinical Infectious Diseases (Vol. 66, Issue 7, pp. e1-e48). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>
7. Shetty, N., Wren, M. W. D., & Coen, P. G. (2011). The role of glutamate dehydrogenase for the detection of Clostridium difficile in faecal samples: a meta-analysis. En Journal of Hospital Infection (Vol. 77, Issue 1, pp. 1-6). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.07.024>
8. Eze, P., Balsells, E., Kyaw, M. H., & Nair, H. (2017). Risk factors for Clostridium difficile infections – an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. En Journal of Global Health (Vol. 7, Issue 1). International Global Health Society. <https://doi.org/10.7189/jogh.07.010417>
9. Aràjol, C., Aira Gómez, A., González-Suárez, B., Casals-Pascual, C., Martí Martí, S., Domínguez Luzón, M. Á., Soriano, A., & Guardiola Capón, J. (2021). Selección del donante para la transferencia de microbiota fecal. Documento de posicionamiento de la Societat Catalana de Digestologia y de la Societat Catalana de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica. En Gastroenterología y Hepatología (Vol. 44, Issue 2, pp. 175-180). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2020.07.027>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 180 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 17. Tamizaje de microorganismos MultiDrogo-Resistentes (MDR)

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados

Los carbapenémicos son los antibióticos de primera línea, utilizados en el tratamiento de enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Por ello, la vigilancia de la ocurrencia de mecanismos de resistencia a estos antibióticos se ha convertido en un reto a nivel mundial, dado que las infecciones por microorganismos resistentes a los carbapenémicos, se asocian a mayor morbilidad y mortalidad por su difícil manejo y falta de opciones terapéuticas. Por ello, entes internacionales como la Organización Panamericana de la Salud ha emitido recomendaciones para su vigilancia epidemiológica (2)(3).

La colonización de Enterobacterales multidrogo-resistente (MDR) en el tracto gastrointestinal en pacientes hospitalizados, sirve como reservorio de estos microorganismos, y potencial fuente de diseminación al personal médico y otros pacientes. De ahí la importancia de medidas de contención que eviten la diseminación de microorganismos MDR. El tamizaje perianal/rectal en la búsqueda de pacientes colonizados es una de ellas, en la cual el laboratorio se ha convertido en la primera línea de contención (2)(3).

Para establecer la vigilancia activa de MDR, es indispensable implementar un protocolo institucional con el apoyo de la Comisión Local de Vigilancia Epidemiológica (COLOVE), así como el Comité de Infecciones Asociadas a la Salud (IAAS), personal médico y enfermería, basado en la epidemiología local. A través de este, se determina cuáles son los pacientes que se deben tamizar. Lo anterior, debido al alto costo económico de las metodologías empleadas para su detección.

En el escenario nacional, se realiza el tamizaje de organismos productores de carbapenemasas (CPO, por sus siglas en inglés) en hospitales especializados, nacionales, regionales y periféricos. Su empleo se realiza en el estudio de brotes intrahospitalarios, traslado de pacientes a otros centros y aislamiento de contactos a partir de un caso de infección por CPO.

En el Hospital Nacional de Niños se realiza además el tamizaje de enterobacterias productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) y AmpC desreprimidos, acorde con el grupo poblacional de atención.

Para efectos del presente manual, se desarrollará el procesamiento del tamizaje de CPO. En cuanto a otros tamizajes, se sigue los principios aquí dispuestos, en apego además de las indicaciones del fabricante de las pruebas disponibles.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 181 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Se recomienda analizar en el seno de COLOVE la pertinencia de los tamizajes, de acuerdo con las características de cada centro médico.

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento (2-3)	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, edad
Datos de la muestra	-Fecha y hora de la toma de muestra. Servicio que envía la muestra. Tipo de muestra
Muestras clínicas indicadas	
-Hisopado perianal/rectal en medio de transporte AMIES en gel sin carbón.	
Criterios de rechazo	
-Muestras tomadas en aplicadores de algodón.	-Aplicadores que, en apariencia, no contengan materia fecal.
-Muestras que han transcurrido más de 24 horas (a temperatura ambiente o en refrigeración) desde la recolección.	-Muestras que su rotulación sea inadecuada o no coincida con los datos de la orden médica. Muestras sin rotular
-Muestra de heces.	
Observaciones	
-Las muestras deben ser tomadas insertando el aplicador hasta 1cm en el recto, rotar suavemente y retirar, es importante recoger muestra suficiente.	-No se debe emplear lubricantes para la recolección de la muestra.
Recipiente indicado para la recolección	
- Hisopo de dacrón o rayón en medio de transporte -AMIES en gel sin carbón. -AMIES en medio líquido	-Si el Laboratorio Clínico cuenta con métodos de detección molecular, utilizar los aplicadores recomendados por el fabricante.
Condiciones de transporte	
-Se debe transportar la muestra a temperatura ambiente en 2 horas o menos al Laboratorio Clínico. -Si la muestra no puede ser enviada inmediatamente, se debe refrigerar a 4°C hasta un máximo de 24 horas. -En caso de pacientes que serán trasladados a otro centro, el envío oportuno es de particular importancia para su procesamiento por técnica de diagnóstico molecular (según capacidad instalada).	

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento de muestras

- El protocolo para la determinación de microorganismos MDR, está indicado en lineamientos internacionales como el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) y nacionales como el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología (CNRB) del Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (Inciensa) (1)(4).
- Para el estudio de contactos de un paciente confirmado con CPO, se requiere la realización del tamizaje en tres ocasiones, de forma consecutiva. La periodicidad de los tamizajes será definida localmente por el Comité de Vigilancia Epidemiológica correspondiente. En orden para levantar el aislamiento de contacto, se requiere resultados negativos en los tres reportes.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 17.1 Equipos e insumos requeridos para realizar tamizajes de MDR		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales
Cámara de bioseguridad Incubadora bacteriológica a 35-37°C	Sistema automatizado para ID Y PSA	No requiere
Medios de cultivo	Insumos	Pruebas complementarias ¹
Agar Sangre (COS) Agar MacConkey (MCK) Agares cromogénicos para detección de las resistencias (CARBA)	Asas bacteriológicas	Técnicas moleculares PCR para detección carbapenemasas Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas

1. Según disponibilidad del centro.

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico: Detección de MDR (carbapenemasas)

Detección por cultivo

1. Inocule con el aplicador de la muestra, directamente en los medios de cultivo MCK, y en medios cromogénicos para carbapenemasas de acuerdo al proceso de tamizaje específico.
2. Realice la siembra por dispersión/agotamiento en cuadrantes con el fin de aislar las colonias en los medios indicados.
3. Incube a 35 – 37° C en atmósfera de aerobiosis, durante un mínimo de 24 horas.
4. Verifique el crecimiento en los medios de cultivo.
 - a. MCK: Este medio tiene como función validar la presencia de microbiota entérica en la muestra.
 - i. Si no se observa crecimiento de bacilos Gram negativo, se invalida la prueba.
 - ii. Si se observa crecimiento de bacilos Gram negativo, se procede con la valoración del medio cromogénico.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 183 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- b. Medios cromogénicos: verifique la presencia de colonias características para Enterobacterales, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp., según la indicación del fabricante (revisar en detalle los insertos).
5. En caso de observar colonias sospechosas en los medios de cultivos indicados en los puntos a y b, realice un nuevo aislamiento en COS, utilizando asa estéril, realizando la siembra por dispersión/agotamiento en cuadrantes con el fin de aislar colonias.
6. Incube a 35 – 37° C en atmósfera de aerobiosis, durante un mínimo de 24 horas.
7. Realice prueba de identificación y PSA.
8. Verifique parámetros de vigilancia de carbapenemasas vigentes. El cuadro 17.2 muestra los puntos de corte actualizados al año 2023.
9. Realice la confirmación de la presencia de enzimas carbapenemasas, utilizando uno de los métodos recomendados por CLSI; o bien, mediante inmunocromatografías de flujo lateral o técnicas de PCR.
10. En caso de no contar con un método de confirmación, envíe el aislamiento al CNRB y reporte como sospechoso de portar enzimas carbapenemasas.
11. En aquellos casos muy sugestivos en los cuales no se detecte con las pruebas disponibles, ninguna resistencia mediada por enzimas, también deberán ser referidos al CNRB y reportar como pendiente de detección/confirmación del mecanismo de resistencia.

Cuadro 17.2 Criterios de sospecha para detección de carbapenemasas en equipos automatizados en 2023.

Microorganismos	Cefalosporinas	Carbapémicos
Enterobacterales	No aplica	Imipenem $\geq$ 2 Meropenem $\geq$ 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	Ceftazidima $\geq$ 16	

Detección por método molecular

1. Utilice los aplicadores recomendados por el fabricante. Deben ser al menos dos aplicadores con muestra, con el fin de que se utilice uno para el procesamiento molecular y el otro como respaldo.
2. Procese la muestra según las instrucciones que indique el fabricante.
3. Reporte preliminarmente el resultado indicado por el equipo.
 - a. En caso de prueba negativa (No detectado), realice el cultivo en MCK y medios cromogénicos de resistencias del aplicador de respaldo.

- i. Si no hay crecimiento a las 24 horas en MCK, reporte comentario: Riesgo de falso negativo por muestra escasa. Favor enviar nueva muestra.
 - ii. Si hay crecimiento de colonias sugestivas en el agar cromogénico, de acuerdo con las indicaciones del fabricante, siga el procedimiento de la detección por cultivo a partir del punto 4.
- b. En caso de prueba con resultado positivo, no requiere confirmación por cultivo. Proceda a realizar el reporte final.

La figura 17.1 detalla el algoritmo de trabajo general para el tamizaje de carbapenemasas en hisopados perineales.

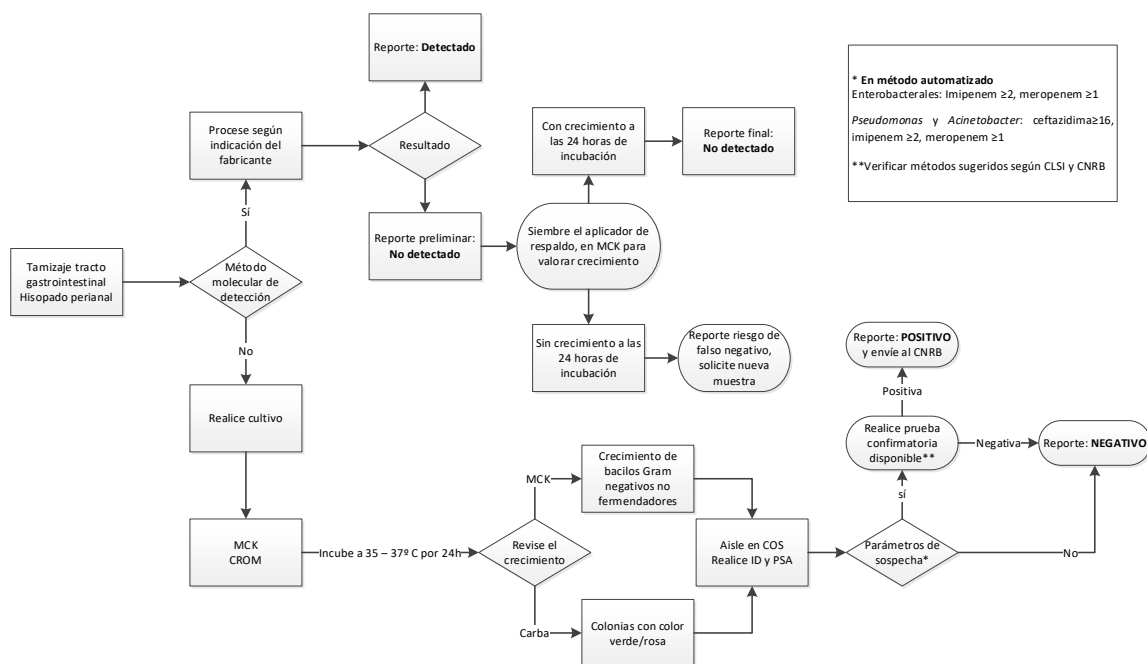


Figura 17.1 Esquema de trabajo (sugerido) para la detección de carbapenemasas en hisopados perianales

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 185 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

POSANALÍTICA

Reporte de resultados (4)

Método de cultivo

1. Reporte de resultados negativos:
 - a. **“NEGATIVO”.**
2. Reporte de resultados indeterminados: Si no hay crecimiento en MCK a las 24 horas:
 - a. **“Reporte final: NO VALORABLE, no hay evidencia de enterobacterias en la muestra. Se sugiere repetir”.**
3. Reporte de resultados positivos confirmados según disponibilidad de métodos locales:
 - a. **“POSITIVO. Cepa productora de enzima carbapenemasa [INDICAR EL TIPO]. Se sugiere aislamiento de contacto e interconsulta con Infectología”.**
4. Reporte de aislamientos no confirmados/indeterminados (Centros sin disponibilidad de pruebas confirmatorias de carbapenemasas):
 - a. **“Crecimiento de microorganismo sospechoso de producir carbapenemasas. Se sugiere aislamiento de contacto e interconsulta a Infectología. Se envía cepa al CNRB para su confirmación”.**

Método molecular

1. Reporte de resultados negativos:
 - a. Reporte de forma preliminar:
 - viii. **“NO DETECTADO. Pendiente de confirmación por cultivo en 24 horas”.**
 - b. Si no hay crecimiento en MCK a las 24 horas:
 - ix. **“Reporte final: NO VALORABLE, no hay evidencia de enterobacterias en la muestra. Se sugiere repetir”.**
 - a. Si hay crecimiento en MCK a las 24 horas:
 - i. **“Reporte final: NO DETECTADO”.**

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 186 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

2. Reporte de resultados positivos:

- a. **“DETECTADO [indicar el gen o genes detectados]. Portador de microorganismo productor de carbapenemasas. Se sugiere aislamiento de contacto e interconsulta con Infectología”.**

REFERENCIAS

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (2022). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
2. Wangchinda, W., Thamlikitkul, V., Watcharasuwanseree, S., & Tangkoskul, T. (2022). Active surveillance for carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) colonization and clinical course of CRE colonization among hospitalized patients at a university hospital in Thailand. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(10), 1401. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101401>
3. Oteo, J., Bou, G., Chaves, F., & Oliver, A. (2017). Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(10), 667–675. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.013>
4. Centro Nacional de Referencia de Bacteriología (2013). Detección de enterobacterias con carbapenemasas de tipo Metallo- β -lactamasas IMP en Costa Rica.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 187 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 18. Diagnóstico microbiológico de infecciones por bacterias anaerobias

FASE PREANALÍTICA

Solicitud del análisis: Cuadros clínicos asociados (1-2)

Las bacterias anaerobias están implicadas en cuadros clínicos en muchas partes del cuerpo, entre las cuales destacan:

- Piel y tejidos blandos (abscesos cerebrales, infecciones crónicas o abscesos, mordeduras humanas o por animales).
- Pleuropulmonares (neumonía por aspiración, abscesos pulmonares).
- Intraabdominales (peritonitis secundaria, perforación intestinal).
- Tracto genital femenino (amnionitis, endometritis, abscesos tubo-ováricos)
- Infecciones orales y dentales.

Entre los factores que predisponen las infecciones por anaerobios, se incluyen:

- Trauma de piel o membranas mucosas.
- Extracciones dentales.
- Irrigación sanguínea deficiente (trauma, cuerpos extraños, cirugías, cáncer, enfermedad vascular, colitis).
- Necrosis de tejidos.

En cuanto a los signos y síntomas asociados a infecciones por anaerobios, destacan:

- Descargas con mal olor
- Formación de abscesos y tejido necrótico
- Liberación de gas del tejido
- Hemocultivos aerobios negativos: bacteriemia o endocarditis
- Infecciones relacionadas con tumores
- Tromboflebitis infectada
- Infecciones asociadas a mordeduras
- Coloración negruzca de algunos exudados

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 188 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Presentación de tejido “muerto” (gangrena)
- Enfermedades asociadas con el uso de antimicrobianos para bacterias aerobias
- Infecciones crónicas

Muestras clínicas, transporte y conservación

Tabla Resumen. Información requerida para el procesamiento	
Datos del paciente	-Nombre completo, número de identificación, servicio, edad, diagnóstico de base, cuadro clínico, antibioticoterapia
Datos de la muestra	-Fecha de recolección, tipo de muestra, sitio anatómico, técnica de obtención.
Muestras clínicas indicadas (2)	
- <u>Aspirados</u> : cualquier aspirado de un sitio normalmente estéril es aceptable, tales como: sangre, médula ósea, pleural, peritoneal.	- <u>Úlceras superficiales</u> : asepsia del sitio, debridación del tejido expuesto y recolección del material en la zona profunda de la úlcera. Tejido o aspiración de líquido (no sangre).
- <u>Abscesos superficiales</u> : debridar tejido. - <u>Abscesos profundos</u> : aspirar con catéter, sondas o cirugías.	- <u>Tejidos</u> : cualquier muestra de tejido obtenida por cirugía es adecuada.
- <u>Tracto respiratorio</u> : se requieren procedimientos quirúrgicos o invasivos con agujas o catéteres que lleguen hasta los sitios deseados.	- <u>Tracto genitourinario</u> : Aspiración suprapúbica (orina), culdocentesis (para obtener muestras del saco vaginal), succión de la pared endometrial, procedimientos quirúrgicos.
Criterios de rechazo (2)	
-Muestras no rotuladas o con datos incongruentes.	-Muestras derramadas o en las que no se pueda asegurar la esterilidad del recipiente.
-Torunda de garganta, nasofaringe o cualquiera de la mucosa oral.	-Espujo expectorado, lavados bronquiales, aspirados.
- Contenido gástrico.	-Muestras de orina no tomadas por punción suprapúbica.
- Torundas vaginales, cervicales o uretrales.	- Torundas de abscesos.
- Heces o torundas rectales.	-Las recolectadas a través de la cavidad oral
-Muestras en jeringa.	-Se rechazan todas las muestras que se contaminen con bacterias de la microbiota.
Observaciones	
-Las muestras deben enviarse lo más pronto posible al Laboratorio Clínico desde su recolección, pues la viabilidad de las bacterias por exposición al oxígeno puede verse comprometida (1-2). Su procesamiento debe ser inmediato. Coordinarse previamente con el laboratorio y transportarse a mayor brevedad.	-En muestras tomadas con jeringa, una vez realizada la aspiración, se debe transferir inmediatamente el contenido a un tubo al vacío estéril sin aditivos ni anticoagulantes, caldo Chopped Meat o medio de transporte pre-reducido.
Recipiente indicado para la recolección	
-Medios de transporte pre-reducidos para anaerobios.	-Caldo Chopped Meat: Si bien no es un medio de transporte, se puede emplear para este fin.
-Tubo al vacío sin aditivos ni anticoagulantes.	-Recipientes de boca ancha estériles solo para huesos.
Condiciones de transporte (2)	
-Las muestras deben transportarse inmediatamente al Laboratorio Clínico en contenedores estériles con cierre hermético que sean apropiados al tamaño y que permitan mantenerlas en condiciones adecuadas de humedad, sin añadir formol ni otros preservantes.	
-La muestra no debe ser refrigerada ni congelada. Siempre transportar a temperatura ambiente.	

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 189 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: <i>MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023</i>

-No se deben transportar muestras en jeringa (con aguja es muy riesgoso, sin aguja se puede perder el material o exponer al oxígeno. Si el tiempo es corto, se pueden usar tapones de hule, sin embargo estos insumos no están disponibles en el país al momento de la edición del manual).

-Según disponibilidad, se pueden emplear medios de transporte pre-reducidos, tales como: Caldo Chopped Meat, medio de transporte tioglicolato+solución salina+cisteína, medio de transporte BHI/PY+cisteína.

FASE ANALÍTICA

Consideraciones generales de procesamiento

- Mientras sea factible, las muestras se deben recolectar antes de la administración de agentes antimicrobianos.
- Se debe recolectar la muestra de manera que se minimice la contaminación con microbiota normal.
- Las muestras deben ser procesadas en una cabina de bioseguridad.
- El estudio de bacterias anaerobias debe realizarse en forma paralela al estudio por microorganismos aerobios, de tal forma que se puedan contrastar los hallazgos para definir los agentes patógenos asociados con el cuadro clínico en cuestión.
- En la ejecución del cultivo de anaerobios, es posible recuperar microorganismos facultativos o fastidiosos, que crecen mejor en condiciones de anaerobiosis; por tanto, deben ser considerados y jerarquizados en el contexto del procesamiento aerobio y anaerobio de la muestra.

Equipos e insumos requeridos

Cuadro 18.1 Equipos e insumos requeridos para realizar cultivo de bacterias anaerobias		
Activos base	Analizadores base	Activos adicionales ¹
-Cámara de bioseguridad -Incubadora bacteriológica a 35-37°C - Microscopio de luz	-Sistema automatizado para ID Y PSA	-Sistema MALDI-TOF -Incubadora bacteriológica de CO2 a 37°C -Cámara de anaerobiosis -Sistema miniaturizado de ID bioquímica rápida
Medios de cultivo ²	Insumos	Pruebas complementarias
Agar Sangre (COS) Agar Sangre suplementado para anaerobios (ASS) Agar Sangre suplementado + neomicina (ASN) Agar Fenil-etil Alcohol Sangre (PEA) Agar Bacteroides Bilis Esculina (BBE) Agar Sangre Lisada Kanamicina Vancomicina (LKV) Agar Yema de huevo (AYH) Medio líquido de enriquecimiento Caldo Chopped Meat (CCM)	Reactivos para tinción Gram (modificado) Asas bacteriológicas Sistema generador de atmósfera de capnofilia Sistema generador de atmósfera de anaerobiosis Indicadores REDOX Portaobjetos Alcohol de 70%	Oxidasa Catalasa Coagulasa en lámina String test (KOH al 3%) Técnicas moleculares ¹

1. Según disponibilidad del centro
2. Es posible trabajar cultivo de anaerobios únicamente con Agar Sangre. La utilización de los medios selectivos y diferenciales se seleccionan de acuerdo con las muestras que se cultivan

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 191 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Procesamiento de la muestra para diagnóstico microbiológico (2)

1. Verifique la rotulación del recipiente con la muestra y valide la información con la solicitud.
2. Procese la muestra en una cámara de bioseguridad, de acuerdo a los apartados para cada tipo de muestra descritos en este manual.
3. Para el examen microscópico, fije el frotis con metanol (no con calor), y en la tinción de Gram sustituya la safranina con fucsina básica 0.1% (Gram modificado).
4. En forma paralela al cultivo por microorganismos aerobios, inocule en la primera zona los medios de cultivo sólidos para anaerobios con los que disponga. En caso de no contar con ellos, inocule una placa adicional de COS.
5. Extienda el inóculo con distribución por agotamiento en cuatro zonas con asa estéril.
6. Inocule un Caldo Chopped Meat (CCM) con un máximo de 0.3 mL de muestra y un frasco de cultivo líquido automatizado con la cantidad de muestra mínima de 1 mL y máximo de acuerdo con la especificación por el fabricante. La muestra se carga mediante punción del tapón de hule en ambos (en tanto se disponga con suficiente muestra).
7. Incube a 35 - 37°C durante 7 días en anaerobiosis, con revisión de placas a las 48 horas, 5 días y 7 días (revisión final).
8. Verifique que el indicador REDOX permanezca en su forma reducida en todo momento de incubación, para validar el resultado del cultivo anaerobio.
9. Compare el crecimiento microbiano en anaerobiosis con respecto a los medios de cultivo incubados en aerobiosis y capnofilia.
10. Realice una prueba de aerotolerancia a las colonias sospechosas que crecen en los medios en anaerobiosis pero que no se evidencian en los medios para microorganismos aerobios. Es importante considerar que la morfología colonial de las bacterias aerobias facultativas que crecen en ambas condiciones, suele variar considerablemente.
 - a. Para ello, repique cada colonia sospechosa a 3 placas de ASS (preferiblemente, de contar con el medio de cultivo) o en COS, e incube una en anaerobiosis, una en capnofilia y una en aerobiosis a 35 – 37 °C durante 48 horas.
 - b. Interprete según el cuadro 18.2 (2).

11. Si no hay crecimiento en las placas primarias en anaerobiosis y se evidencia turbidez en el caldo Chopped Meat, inocule una gota del caldo en los medios sólidos para bacterias anaerobias con los que disponga o en COS, en caso de no contar con ellos.
12. Valore el crecimiento en estas placas en los períodos descritos anteriormente y realice prueba de aerotolerancia a las colonias sospechosas.
13. Realice ID según las posibilidades del centro de trabajo, (ID bioquímica automatizada, miniaturizado de ID bioquímica rápida, MALDI TOF) a las colonias con prueba de aerotolerancia que señalan el perfil de una bacteria anaerobia:
 - a. Perfil anaerobio aerotolerante
 - b. Bacilos Gram positivo anaerobios
 - c. Perfil de anaerobio estricto
14. Las colonias que no resultaron con un perfil de bacteria anaerobia (aerobio, aerobio facultativo), deben revisarse con en el contexto del cultivo aerobio realizado a partir de la muestra. Valore si es pertinente recuperar el microorganismo en caso de no haber sido aislado en el primocultivo.

Nota: Si se requiere tinción de Gram modificado de la colonia, se sugiere efectuar el “string test”, dado que la coloración de Gram en bacterias anaerobias puede generar resultados inconclusos.

Cuadro 18.2. Interpretación del requerimiento atmosférico de bacterias a partir de la prueba de aerotolerancia.

Aerobiosis	Capnofilia	Anaerobiosis	Interpretación
++ ¹	-/+	-	Aerobio estricto
+ / ++	++	- / +	Aerobio facultativo
-	+	++	Anaerobio aerotolerante
-	++	++	Especies de <i>Actinomyces</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Propionibacterium</i> ²
-	-	++	Anaerobio estricto

- : sin crecimiento; + : crecimiento escaso; ++ : crecimiento abundante

1. Para valorar la magnitud del crecimiento en cruces, se debe comparar el crecimiento en las 3 condiciones atmosféricas en conjunto.
2. Especies de *Propionibacterium* pueden presentar crecimiento escaso en condiciones de aerobiosis.

Análisis e interpretación de cultivos (1-2)

- o La diversidad de cuadros clínicos en los que las bacterias anaerobias pueden estar implicadas es muy amplia, de manera que su etiología varía acorde al sitio anatómico del cual son aisladas.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 193 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- Las bacterias anaerobias pueden ser patógenos oportunistas si se presenta el ambiente adecuado en el hospedero, y en muchas ocasiones están precedidas por una infección por bacterias aerobias.
- La mayor parte de las infecciones son polimicrobianas y de origen endógeno, con algunos pocos casos exógenos como el tétanos y el botulismo.
- Un criterio de sospecha de infección por anaerobios es la presencia de diferentes morfologías o pleomorfismo en la tinción de Gram
- En el cuadro 18.3 se muestran los principales agentes etiológicos según el cuadro clínico o sitio anatómico de aislamiento (1-2).

Cuadro 18.3 Principales bacterias anaerobias implicadas en infecciones en seres humanos.

Cuadro Clínico	Principales bacterias anaerobias implicadas
Absceso cerebral	Cocos Gram ⁺ 1, Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Actinomyces</i>
Empiema subdural	<i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Actinomyces</i>
Otitis media crónica	<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> pigmentadas, Cocos Gram+ <i>Fusobacterium</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> grupo <i>Propionibacterium</i>
Sinusitis crónica	<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> pigmentadas, Cocos Gram+ <i>Fusobacterium</i> , <i>Propionibacterium</i>
Mastoiditis	<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> pigmentadas, Cocos Gram+ <i>Fusobacterium</i>
Tonsilitis, adenoiditis y nasofaringitis purulenta	<i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> pigmentadas <i>Prevotella</i> no pigmentadas Cocos Gram ⁺ 1
Abscesos peritonsilares, laterales o retrofaríngeos	<i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> pigmentadas <i>Fusobacterium</i> , Cocos Gram ⁺ 1 <i>Clostridium</i>
Angina de Ludwig	<i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> <i>Bacteroides</i> , Cocos Gram ⁺ 1
Síndrome de Lemierre	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
Infecciones orales (gingivitis, periodontitis, angina de Vincent)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>F. necrophorum</i> <i>Prevotella intermedia</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. buccae</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> <i>Actinomyces</i> , Cocos Gram ⁺ , BGP no esporulados ²
Mediastinitis	<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , Cocos Gram ⁺ 1 <i>Bacteroides fragilis</i> grupo, <i>Clostridium</i>
Infecciones pulmonares (neumonía por aspiración, neumonitis necrotizante, abscesos pulmonares)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>F. varium</i> <i>Prevotella intermedia</i> , <i>P. melaninogenica</i> <i>P. oralis</i> , <i>P. buccae</i> <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> <i>Veillonella</i> , <i>Bacteroides</i> , Cocos Gram ⁺ 1



Empiema pleural	<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> pigmentadas <i>Fusobacterium</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Bacteroides</i> , Cocos Gram + ¹
Absceso mamario	<i>Prevotella</i> , <i>Actinomyces europeus</i> , <i>Cutibacterium acnes</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.
Apendicitis	<i>Bacteroides</i> , <i>Bilophila</i> , <i>Sutterella</i> <i>Fusobacterium</i> , <i>Clostridium</i> , Cocos Gram + ¹
Diverticulitis	<i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Clostridium</i> Cocos Gram + ¹ , BGP no esporulados
ITU (cistitis, prostatitis, uretritis, pielonefritis)	<i>Prevotella</i> y <i>Porphyromonas</i> pigmentadas <i>Bacteroides</i> , Cocos Gram + ¹
Abscesos parauretrales, periuretrales, renales y retroperitoneales, gangrena escrotal	<i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> Cocos Gram + ¹ <i>Prevotella</i> y <i>Porphyromonas</i>
Abscesos de glándulas de Bartolino, Skene y labiales, hidradenitis, furunculosis	<i>B. fragilis</i> (grupo), <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> <i>Clostridium</i> , Cocos Gram+ ¹
Endometritis	<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> <i>Actinomyces</i> , <i>Veillonella</i> Cocos Gram+ ¹ , <i>Eubacterium</i> , <i>Bacteroides</i>
Salpingitis, absceso tubo-ovárico, enfermedad inflamatoria pélvica	<i>Bacteroides</i> , <i>Actinomyces</i> , Cocos Gram+ ¹ <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i>
Gastroenteritis aguda	<i>Clostridium perfringens</i> tipos A y C
Diarrea asociada a antibióticos	<i>Clostridium difficile</i> <i>C. perfringens</i> y <i>B. fragilis</i> enterotoxigénicos
Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>
Botulismo	<i>Clostridium botulinum</i>
Fascitis necrotizante	Anaerobio + facultativo = <i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , Cocos Gram + ¹
Mionecrosis clostridial (gangrena)	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. histolyticum</i> , <i>C. novyi</i> , <i>C. sordellii</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. bifermentans</i> , <i>C. fallax</i>
Mionecrosis anaerobia sinérgica	Cocos Gram + ¹ , <i>Bacteroides</i> <i>Clostridium</i>
Gangrena vascular infectada	Cocos Gram + ¹ , <i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i>
Fascitis necrotizante	<i>Clostridium</i> , Cocos Gram + ¹ <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i>
Abscesos perirrectales	Cocos Gram + ¹ , Grupo <i>B. fragilis</i> , <i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i> , <i>Eggerthella</i> BGP+ no esporulados, <i>Prevotella</i>
Bacteriemias	Grupo <i>B. fragilis</i> <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. septicum</i> <i>F. nucleatum</i> , <i>F. necrophorum</i> Cocos Gram +, <i>Cutibacterium acnes</i>
Actinomicosis	<i>Actinomyces israelii</i> , <i>Actinomyces</i> spp. <i>Eubacterium</i> , <i>Propionibacterium propionicus</i>

1. Cocos Gram +: *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Finnegoldia magna*, *Parvimonas micra*, *Peptococcus niger*.
2. Bacilos Gram positivo no esporulados: *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Cutibacterium*, *Eubacterium*, *Eggerthella*, *Collinsella*, *Atopobium*, *Mobiluncus*.

FASE POSANALÍTICA

Reporte Tinción Gram

Las tinciones de Gram se observan e informan lo más rápido posible en tiempo y forma. Las muestras intraoperatorias se deben informar con carácter de urgencia. Se reportan todos los microorganismos presentes, así como la presencia de leucocitos y su distribución. Se debe determinar el número de células y microorganismos, basándose en el cuadro 18.4 (3).

Cuadro 18.4 Componentes del reporte de tinción de Gram en muestras clínicas

Tipo de célula	Cuantificación en cruces (utilizar lente 10X)
Células epiteliales	No se observan
Leucocitos	1+ : Menos de 1/campo 2+ : De 1 a 9 / campo 3+ : de 10-25/ campo 4+ : Mas de 25/campo
Tipo de microorganismo observado	Cuantificación en cruces (Observar en lente de inmersión)
Cocos Gram Positivo Bacilos Gram Positivo Cocobacilos Gram Positivo Diplococos Gram Positivo Bacilos Gram Negativo Diplococos Gram Negativo Cocobacilos Gram Negativo Cocos Gram Negativo Bacilos Gram variable Cocobacilos Gram Variable Levaduras Micelio	No se observan 1+ : Menos de 1/campo 2+ : De 1 a 5/ campo 3+ : de 6-30/ campo 4+ : Mas de 30/campo
Adicionalmente, se puede describir el arreglo microscópico observado: en cadenas, en grumos, lanceolados, ramificados, filamentosos, tipo corinebacteria o difteroides, fusiforme, curvo, entre otros.	

Reporte de cultivo preliminar y presuntivo

- Debido a que el procesamiento por bacterias anaerobias requiere un período más prolongado en comparación al estudio por bacterias aerobias, cuando se obtenga el reporte final de aerobios, reporte lo indicado. Si para este momento se tiene alguna información del cultivo por anaerobios, reporte la sospecha preliminar para orientar la terapia antimicrobiana.
 - "Estudio por bacterias anaerobias en proceso".**
- Si no se llevó a cabo cultivo por bacterias anaerobias y se observaron morfotipos en la tinción de Gram que no crecieron en el cultivo por aerobios, se debe reporte:

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 196 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- a. **“Sospecha de bacterias anaerobias implicadas en el proceso infeccioso por evidencia de morfotipos bacterianos en el frotis que no crecen en cultivo aerobio. Tomar en consideración para el abordaje terapéutico”.**

Reporte de cultivo negativo

1. Ante la ausencia de crecimiento en cultivo líquido y sólido tras 7 días de incubación en anaerobiosis, reporte:
 - a. **"Cultivo negativo por bacterias anaerobias".**
2. Reporte de cultivo polimicrobiano (no valorable): Realice el reporte de cultivo polimicrobiano que no puede ser jerarquizado, de acuerdo al tipo de muestra y lo descrito en cada apartado de este manual.

Reporte de cultivo positivo

1. Ante la evidencia de bacterias anaerobias en cultivo, reporte su identificación, de acuerdo a la técnica empleada (ID bioquímica automatizada, miniaturizado de ID bioquímica rápida, MALDI-TOF).
 - a. **“[ID del microorganismo]”.**
2. Ante la recuperación de bacterias anaerobias en cultivo o medio líquido, donde no sea posible establecer una identificación por las plataforma de trabajo del Laboratorio, realizar un reporte descriptivo basado únicamente en el género. En caso de no poder establecer el género, reportar la tinción Gram del aislamiento. Por ejemplo: **Bacilo Gram negativo anaerobio estricto, no es posible realizar ID definitiva.**
3. **Reporte de PSA:** La prueba de sensibilidad a antimicrobianos para bacterias anaerobias no se realiza de rutina en los laboratorios de microbiología clínica. Se lleva a cabo en laboratorios de investigación, asuntos de interés epidemiológico en circunstancias específicas o en determinaciones periódicas para la evaluación de la resistencia a nivel local (por ejemplo, cada 6 meses) (2).

REFERENCIAS

1. Brook, I. (2008). Anaerobic infections: Diagnosis and management. New York, USA: Informa Healthcare.
2. Rodríguez, E. & Quesada, C. (2008). Bacteriología anaerobia: Principios clínicos y diagnóstico de laboratorio. San José, Costa Rica: Lara Segura & Asociados.
3. Leber, A. L. (Ed.4). (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818814>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 197 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Módulo 19: Aseguramiento de la calidad en Bacteriología

El aseguramiento de la calidad en bacteriología comprende una serie de actividades y acciones relativas a garantizar la calidad en la prestación de los servicios. Está circunscrito dentro del sistema de gestión de calidad que todo laboratorio clínico debe tener instaurado. El objetivo básico del aseguramiento de la calidad es generar confianza en el usuario que recibe el reporte final de laboratorio. Esto solamente puede ocurrir si el personal ha utilizado todas las herramientas del laboratorio de manera adecuada, mediante las buenas prácticas y los estándares aprobados para los diferentes ensayos, los cuales deben estar validados. La estandarización se logra cuando los resultados de las pruebas tienen la misma exactitud y precisión analítica en todos los sistemas de medición, laboratorios y a lo largo del tiempo.

Para ello se requiere de un programa de aseguramiento de la calidad que incluye los siguientes elementos.

- Personal con adecuada competencia y entrenamiento.
- Recolección, almacenaje y transporte adecuado de muestras.
- Utilización de técnicas de alta precisión y veracidad.
- Realización adecuada de los ensayos.
- Gestión eficiente de los resultados.
- Buena calidad de reactivos y equipos.
- Métodos para detección de errores.
- Acciones correctivas cuando los análisis se salen de control.
- Mantenimiento preventivo y correctivo de los equipos.
- Educación continua del personal.
- Documentación.
- Coordinación.
- Retroalimentación oportuna.

El aseguramiento de la calidad debe implementarse en las tres fases de todo el proceso de laboratorio en Microbiología y ser evaluada mediante indicadores de desempeño.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 198 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

FASE PREANALÍTICA

Muestras idóneas

1. Revise su oferta de servicios y las muestras ideales para bacteriología.
2. Verifique la disponibilidad de los insumos adecuados. Realice los ajustes necesarios para obtener insumos adecuados o bien, revise si existen alternativas viables.
3. Elabore un listado con las muestras ideales. Ayúdese con las muestras incluidas en este manual.
4. Socialice el listado con el personal médico y el encargado de tomar las diferentes muestras para bacteriología.
5. Realice actualizaciones periódicas (al menos 1 vez por año) para verificar tipos de muestra faltantes, modificaciones de la literatura o alternativas de acuerdo con las necesidades.
6. Establezca mecanismos de retroalimentación para comunicar desviaciones observadas en las muestras recibidas.
7. Asegúrese que el personal reciba capacitación adecuada en los criterios de rechazo de muestras. Documente las capacitaciones.

Boleta de análisis

1. Revise que las boletas de análisis cuenten con todos los requerimientos establecidos para la aceptación de las muestras.
2. Establezca mecanismos de retroalimentación para comunicar errores o faltantes de información esenciales en las boletas de análisis.

Almacenamiento y transporte

1. Revise la disponibilidad de los insumos necesarios para garantizar el adecuado almacenamiento y transporte de las muestras de bacteriología. Realice los ajustes necesarios para obtener insumos adecuados o bien, revise si existen alternativas viables.
2. Comunique al personal encargado de la toma, almacenamiento y transporte de las muestras sobre los requerimientos para garantizar su adecuado procesamiento.
3. Establezca estrategias de capacitación continua para el personal nuevo que tiene funciones relacionadas con la toma almacenamiento y transporte de muestras.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 199 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

4. Establezca mecanismos de retroalimentación para comunicar errores o faltantes de información esenciales en el almacenamiento y transporte.

FASE ANALÍTICA

Calidad de reactivos e insumos

1. Establezca un programa de capacitaciones de personal para minimizar la contaminación de reactivos e insumos.
2. Verifique siempre las condiciones de transporte y almacenamiento de los reactivos e insumos antes de iniciar su uso.
3. Almacene los reactivos e insumos de acuerdo con las condiciones especificadas por el fabricante.
4. Asegúrese que los reactivos e insumos tengan rotulación donde se indique nombre del producto, condiciones de almacenamiento, fecha de caducidad.
5. Rotule los reactivos e insumos con la fecha de ingreso y la fecha de inicio de su uso. Especifique la fecha máxima de uso si hay recomendación máxima de uso después de abierto.
6. No utilice reactivos o insumos fuera de su fecha de caducidad.
7. Cuando utilice reactivos líquidos en poca cantidad, verifique la posibilidad de realizar alícuotas y almacenarlas a temperatura adecuada para evitar contaminaciones y desperdicios.
8. Realice pruebas de control de calidad con cada nuevo lote de reactivos.
9. Realice controles positivo y negativo según las especificaciones del fabricante. Documente desviaciones en la realización de los controles (cuadro 19.1).
10. Realice comparaciones interlaboratorias usando sus reactivos de la forma prevista.
11. Control de calidad de medios y caldos comerciales:
 - a. Inspeccione las placas o botellas buscando
 - i. quebraduras
 - ii. rajaduras en el agar o derrames del caldo
 - iii. burbujas

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 200 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

iv. distribución heterogénea o resequedad

v. hemólisis o contaminaciones

- b. Registre y notifique al proveedor sobre los hallazgos.
- c. Solicite los controles de calidad realizados por el fabricante (excepto para agar Thayer-Martin y el agar Chocolate, que deben someterse a control de calidad independientemente de si son comerciales o no.

12. Control de calidad de medios y caldos preparados:

- a. Registre la cantidad y tipo de medio preparado, usuario, fecha, lote, pH y fecha de caducidad de los medios ya preparados.
- b. Revise profundidad, color, apariencia, presencia de burbujas, contaminación o hemólisis.
- c. Realice el control de calidad verificando esterilidad, así como crecimiento con los microorganismos recomendados para cada medio (cuadro 19.2). Se recomienda destinar un 5% de cada lote en control de calidad.

13. Control de calidad de la Tinción de Gram

- a. Verifique la apariencia de los reactivos diariamente.
- b. Si el cristal violeta muestra precipitado, filtre nuevamente antes de usar.
- c. Cambie los reactivos regularmente si no se acaban con el uso normal ya que la evaporación puede alterar su desempeño.
- d. Elimine los contenedores de la tinción de Gram al menos mensualmente.
- e. Si sospecha de contaminación elimine todo el reactivo y utilice uno nuevo.
- f. Realice verificaciones semanales del desempeño de los reactivos, utilizando una mezcla de microorganismos Gram negativo y Gram positivo. Si el personal no cuenta con capacitación robusta o es nuevo, puede ser necesario realizar controles diariamente.
- g. Utilice cepas de control de calidad *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) para realizar las verificaciones.
- h. Fije las láminas de control con metanol y proceda con la tinción y verificación de resultados.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 201 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- i. Registre los resultados y realice acciones correctivas de presentar desviaciones a lo esperado.
- j. Asegure la veracidad de la interpretación mediante un sistema de revisión de los reportes de Gram. Realice más capacitación de personal de ser necesario.
- k. Compare los resultados finales con los reportes iniciales de la tinción de Gram. Realice acciones correctivas de presentar desviaciones a lo esperado.
- l. Mantenga un set de láminas de referencia para evaluación de la competencia.

Mantenimiento y calibración de los equipos de laboratorio

1. Establezca los responsables de realizar el mantenimiento y calibración de los equipos de laboratorio.
2. Realice capacitaciones continuas para el personal que utilizan los diferentes equipos de laboratorio.
3. Registre adecuadamente los mantenimientos de acuerdo con la periodicidad solicitada por el fabricante o definida por el laboratorio. Desarrolle registros para el mantenimiento preventivo y bitácoras para el mantenimiento correctivo, donde quede constancia de las personas que realizaron cada uno de ellos.
4. Realice un diagnóstico sobre los equipos críticos que requieren mantenimiento preventivo de forma más exhaustiva y desarrolle estrategias para garantizar su cumplimiento. Estos equipos incluyen, pero no se limitan a: cámaras de bioseguridad, incubadoras, equipo automatizado de identificación y susceptibilidad, refrigeradores, congeladores.
5. Control de calidad de analizadores de identificación y susceptibilidad a antimicrobianos
 - c. Realice la verificación de los estándares de turbidez según las especificaciones del fabricante.
 - d. Realice respaldos de los diferentes cultivos ingresados al equipo de identificación, utilizando la suspensión bacteriana remanente. Puede dividir una placa de agar e inocular varios aislamientos. Si sospecha de la presencia de *Proteus mirabilis* en los aislamientos, realice el respaldo de ese aislamiento particular en un agar sangre separado.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 202 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- e. Realice cultivo de la solución salina utilizada, inoculando diariamente un caldo de enriquecimiento y verificando ausencia de turbidez tras incubar 18-24 h a 35-37 °C. En caso de turbidez:
 - x. Sustituya la solución salina y el dispensador por uno esterilizado.
 - xi. No valide las identificaciones ni las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos que se realizaron con el material contaminado.
 - xii. Repita el proceso de identificación y pruebas de susceptibilidad.
- f. Realice la verificación de las tarjetas de identificación con cada nuevo lote o según las especificaciones del fabricante.
- g. Asegure la disponibilidad de cepas de referencia de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- h. Prepare las cepas de referencia para su uso óptimo antes de realizar el control de calidad de los equipos.

FASE POSTANALÍTICA

Reporte e interpretación de resultados

1. Desarrolle programas de capacitación para normalizar el reporte y la interpretación de los resultados en el laboratorio de microbiología, de acuerdo con los requerimientos institucionales.
2. Revise de manera proactiva y consensuada aquellos resultados cuya interpretación es poco frecuente.
3. Revise los aislamientos identificados y su coherencia con la tinción de Gram y con los respaldos del día anterior. Repita cualquier aislamiento que genere dudas sobre su correcta identificación o susceptibilidad a los antimicrobianos.
4. Comunique los resultados en tiempo y forma oportunos. Establezca límites de tiempo para entrega de los resultados más críticos y evalúe su cumplimiento mediante indicadores (tiempo de respuesta)
5. Establezca registros para la corrección de errores en el reporte e interpretación de resultados. Registre los responsables e involucrados en el abordaje del error.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 203 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

OTRAS ACTIVIDADES DE CALIDAD QUE GARANTIZAN LA ADECUADA PRESTACIÓN DEL SERVICIO

Control de condiciones ambientales

1. Defina las condiciones ambientales adecuadas para la operación de sus equipos según las especificaciones del fabricante.
2. Realice los mantenimientos preventivos y correctivos de aire acondicionado, difusores, detectores de humo y alarma de incendios con la periodicidad establecida por el fabricante.
3. Gestione las necesidades detectadas de su laboratorio en términos de comunicación, ventilación, iluminación, infraestructura, salidas de emergencia y limpieza.
4. Establezca horarios para limpieza de pisos, paredes y ventanas de manera que no interfieran con los procedimientos analíticos y se minimice la posibilidad de contaminación cruzada.

Limpieza de superficies, instrumental, equipos de cómputo y equipos analíticos

1. Establezca los responsables de realizar las diferentes funciones de acuerdo con la periodicidad establecida por el laboratorio.
2. Realice una limpieza con alcohol 70 % en las diferentes superficies antes y después de manipular muestras biológicas y patógenos bacterianos.
3. Realice limpieza frecuente de equipos de cómputo y equipos analíticos de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Manejo de desechos

1. Identifique adecuadamente los recipientes de residuos ordinarios, biopeligrosos, punzocortantes, líquidos y cualquier otro que requiera para los procedimientos de laboratorio.
2. Establezca los horarios de recolección de manera que no interfieran con la rutina y minimice los riesgos de contaminación.
3. Designe responsables para asegurar la sustitución de recipientes biopeligrosos cuando los residuos alcancen máximo $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 204 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Equipo de protección personal (EPP)

1. Revise la disponibilidad de los insumos necesarios para garantizar el uso adecuado de EPP. Realice los ajustes necesarios para obtener los insumos adecuados o bien, revise si existen alternativas viables.
2. Establezca estrategias de capacitación continua en el uso adecuado del EPP.
3. Mantenga en un lugar accesible las guías institucionales sobre el uso adecuado del EPP.

Prevención de accidentes

1. Diseñe flujos de trabajo de laboratorio para minimizar la probabilidad de accidentes laborales.
2. Sensibilice el personal mediante capacitaciones continuas sobre la adecuada higiene de manos y prevención de accidentes.
3. Gestione el control de acceso a las diferentes áreas del laboratorio de microbiología según el riesgo y las actividades que se desarrollan en horarios específicos.
4. Establezca registros para el reporte de los incidentes de laboratorio relativos a las fases preanalítica, analítica y postanalítica. Incluya la información mínima con el menos: identificación del problema, fecha y hora, nombre de las personas involucradas, acciones correctivas tomadas y sus responsables de ejecución, nombre del revisor, fecha de la revisión.
5. Mantenga disponibles las diferentes hojas de seguridad, planes de evacuación y protocolos para la limpieza de derrames químicos y microbiológicos.
 - a. Limpieza de derrames biológicos
 - i. Defina y aísele el área contaminada.
 - ii. Alerte al personal cercano.
 - iii. Vista el equipo de protección personal necesario para la remoción del derrame.
 - iv. Remueva el material sólido como vidrios o plásticos con pinzas o con una palita recolectora.
 - v. Cubra el derrame con papel absorbente.
 - vi. Cubra el papel absorbente con desinfectante apropiado para el derrame.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 205 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

- vii. Permita que el desinfectante actúe por 20 minutos.
- viii. Remueva el papel absorbente y descártelo apropiadamente. Limpie la superficie con alcohol o agua y jabón.
- ix. Registre y notifique el evento a las autoridades correspondientes.

Reporte de brotes

1. Establezca mecanismos para detectar y comunicar brotes intrahospitalarios a los comités locales de prevención de infecciones.
2. Defina las diferentes acciones necesarias para que el laboratorio pueda participar activamente en la detección de nuevas infecciones relacionadas con el brote.
3. Comunique y participe a su jefatura para que apoye en las necesidades emergentes que puedan surgir durante el abordaje del brote.
4. Refuerce las medidas de contención para disminuir las posibilidades de contaminación del personal de laboratorio.

Envío de cepas a otros centros

1. Registre los diferentes aislamientos enviados a centros de referencia o a otros centros para pruebas adicionales no disponibles en su laboratorio.
2. Gestione la adquisición de todo el material necesario para el correcto embalaje y envío de material biopeligroso a otros centros.
3. Realice actividades de capacitación en embalaje y envío de muestras a otros centros.

Elaboración de antibiograma selectivo

1. Elabore antibiogramas selectivos para los principales agentes bacterianos considerando las tasas locales de sensibilidad reportada para los diferentes antimicrobianos, accesibilidad de medicamentos y tipo de paciente a quien va orientada a la terapia.
2. Revise los antibiogramas selectivos al menos anualmente con los servicios involucrados en la atención directa de pacientes.
3. Realice antibiogramas selectivos si su centro concentra poblaciones específicas que reciben terapia antimicrobiana regularmente; por ejemplo, pacientes con fibrosis quística, inmunodeficientes, urológicos, entre otros.

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 206 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos

1. Registre e informe adecuadamente los diferentes eventos de detección de resistencia bacteriana.
2. Realice estadísticas orientadas a evaluar la resistencia bacteriana de la población atendida en su centro de trabajo.
3. Realice consolidados de información sobre la resistencia bacteriana y su distribución en los diferentes agentes microbianos más frecuentes en su población atendida.
4. Presente los datos al menos anualmente a los diferentes servicios o instancias tomadores de decisiones, utilizando las guías vigentes de CLSI.

Control de calidad de hemocultivos

1. Establezca un programa de capacitación para los clínicos sobre la correcta toma, transporte e interpretación de hemocultivos.
2. Mantenga monitoreo sobre los hemocultivos positivos con agentes regularmente asociados a contaminación por microbiota de piel.
3. Determine al menos anualmente la tasa de contaminación de hemocultivos:
 - a. Considere únicamente contaminantes de punción venosa:
 - i. *Staphylococcus no aureus* (SOSA)
 - ii. *Bacillus* spp.
 - iii. *Cutibacterium* spp.
 - iv. *Streptococos* del grupo viridans
 - v. *Lactobacillus* spp.
 - b. Reporte únicamente la identificación para hemocultivos considerados como contaminados, según lo indicado en el capítulo correspondiente a hemocultivos.
 - c. No incluya como contaminantes cultivos con más de dos botellas positivas con el mismo organismo microorganismo del mismo paciente.
4. Realice la retroalimentación al personal médico encargado de la toma de hemocultivos. Las tasas de contaminación máximas permitidas oscilan entre menos de 1.5 y 3% del total de botellas cultivadas por año.

Participación en rondas de aseguramiento de la calidad externa

1. Gestione la participación del laboratorio de microbiología y sus diferentes ensayos realizados en rondas externas de aseguramiento de la calidad.
2. Revise los resultados obtenidos y realice los ajustes necesarios en caso de detectar desviaciones metodológicas o analíticas.
3. Registre los resultados obtenidos en las diferentes rondas de aseguramiento de la calidad.

Cuadro 19.1 Control de calidad para reactivos comunes en bacteriología

Reactivo	Microorganismo control	Resultado esperado	Reacción esperada	Frecuencia de control recomendada
Catalasa	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positivo	Formación de burbujas	Diaria
	<i>Streptococcus</i> spp.	Negativo	No burbujas	
Coagulasa	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positivo	Formación de coágulo en < 4 h.	Diaria
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negativo	No coágulo	
Oxidasa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Positivo	Púrpura en <20 segundos	Diaria
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativo	Sin color a los 20 segundos	
Optochin	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Susceptible	Halo de inhibición >14 mm	Semanal
	<i>Streptococcus</i> grupo viridans	Resistente	Sin halo de inhibición	
Bacitracina	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Susceptible	Halo de inhibición >14 mm	Semanal
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Resistente	Sin halo de inhibición	

Cuadro 19.2 Control de calidad para medios de cultivo comunes en bacteriología

Medio de Cultivo	Incubación	Microorganismo control	Resultado esperado
Agar Chocolate	24-48 h 5-7% CO ₂	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> 43069/70 <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Crecimiento
Agar Thayer Martin	24-48 h 5-7% CO ₂	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> 43069/70 <i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211	Crecimiento

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 208 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

Agar TCBS	18-24h a 35°C	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Colonias azul verdosas
		<i>Vibrio alginolyticus</i> ATCC 17749	Crecimiento colonias amarillas
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibición parcial, colonias pequeñas y traslúcidas
Agar TSI	18-24h a 35°C	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	A/A con producción de gas
		<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	K/A con H ₂ S
		<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659/25933	K/NC
		<i>Shigella sonnei</i> ATCC9290	K/A
Agar Sangre	18-24h a 35°C	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Crecimiento de colonias beta-hemolíticas
	24-48 h 5-7% CO ₂	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	Crecimiento de colonias alfa-hemolíticas
Agar Mac Conkey	18-24h a 35°C	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crecimiento de colonias fermentadoras de lactosa, rosadas
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Crecimiento de colonias no fermentadoras de lactosa, incoloras
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	No crecimiento
Caldo Tetrationato	18-24h a 35°C Rayar en SS (18-24h)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	No crecimiento al platear
		<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	Crecimiento al platear
Caldo Tioglicolato	18-24h a 35°C	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Turbio todo el tubo
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Turbio con presencia de grumos o cadenas
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Turbio principalmente la parte superior del caldo
Caldo Urea	18-24h a 35°C	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativo: no cambia
		<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659/25933	Positivo: fucsia

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. (2012). Quality assurance in bacteriology and immunology. (3th Ed). WHO Regional Office for South-East Asia. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/205730>

	Caja Costarricense de Seguro Social Gerencia Médica Dirección de Desarrollo de Servicios de Salud	Página 209 de 209
MANUAL DE PROCEDIMIENTOS	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE BACTERIOLOGÍA VERSIÓN 1	CÓDIGO: MP.GM-DDSS-ARSDT-CNL-271023

2. Leber, A. L. (Ed.). (2016). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818814>
3. Jorgensen, J. H., Carroll, K. C., Funke, G., Pfaller, M. A., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (Eds.). (2015). Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (2004). M22-A3: Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard 3th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004.

14. Declaración de intereses

Los autores de este documento declaran que no ha existido ningún tipo de conflicto de interés en su realización. Que no poseen relación directa con fines comerciales con la industria sanitaria y no han recibido dinero procedente de la investigación o promoción de dicho tema. Además, declaran no haber recibido ninguna directriz de parte del solicitante o pagador (CCSS) para evaluar técnicamente los resultados presentados. Cada miembro del grupo elaborador llenó su respectivo formulario de declaración de intereses, los cuales serán custodiados por la Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos durante un período de 5 años.

14. Contacto para consultas

Las consultas sobre este manual de procedimientos deberán ser dirigidas a la Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos de la Caja Costarricense de Seguro Social, correo electrónico de la Dra. Ana Lorena Torres Rosales, coordinadora. (atorresr@ccss.sa.cr)