

Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D. C.
Dirección de Salud Pública
Laboratorio de Salud Pública

Guía de infecciones intra-hospitalarias

MARÍA DEL SOCORRO CHALÁ PALACIOS



Luis Eduardo Garzón

Alcalde Mayor de Bogotá, D. C.

Héctor Zambrano Rodríguez

Secretario Distrital de Salud de Bogotá, D. C.

José Fernando Martínez Lopera

Director de Salud Pública

Elkin de Jesús Osorio Saldarriaga

Jefe del Laboratorio de Salud Pública

María Cristina Arboleda Angulo

Laboratorio de Salud Pública

© Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D. C.

Laboratorio de Salud Pública

Calle 13 No. 32-69

Bogotá, D. C.

www.saludcapital.gov.co

Coordinación editorial

Oficina Asesora de Comunicaciones

ISBN 978-958-8313-11-5

Primera edición

Bogotá, mayo de 2007

Diseño, diagramación e impresión

Editorial Linotipia Bolívar y Cía. S. en C.

CONTENIDO

1. Introducción	7
2. Objetivos	9
2.1 Objetivo general	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. Marco legal de la red de laboratorios	11
4. Marco teórico del evento	14
4.1 Definición	14
4.2 Características	14
4.3 Modo de transmisión	16
4.4 Factores de riesgo	16
4.5 Competencias del laboratorio en la vigilancia de las IIH y la resistencia bacteriana	17
4.6 Normas mínimas del laboratorio de microbiología en la vigilancia de resistencia bacteriana	18
4.7 El programa WHONET	21
5. Red distrital de laboratorios	23
5.1 Responsabilidad por niveles	24
6. Bioseguridad	26
6.1 Requisitos para bioseguridad en microbiología	26

6.2	Descontaminación de los mesones de trabajo y otras superficies	27
6.3	Disposición de los materiales contaminados	28
6.4	Autoclave	28
6.5	Prácticas especiales	28
6.6	Eliminación de los residuos peligrosos en el laboratorio de microbiología clínica	32
7.	Control de calidad del evento	35
7.1	Instituciones prestadoras de servicios de salud	35
7.2	Laboratorio de salud pública	37
8.	Procedimiento técnico	40
8.1	Programa de infecciones intrahospitalarias y resistencia bacteriana	40
8.2	Pruebas que realiza el Laboratorio de Secretaría Distrital de Salud a los microorganismos de impacto epidemiológico	41
8.3	Envío de las muestras de los hospitales o clínicas al Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud	42
8.4	Seguimiento de brotes	42
8.5	Estudio de resistencia	43
8.6	Capacitación, asesoría y asistencia técnica	43
8.7	Investigación	43
8.8	Procedimiento técnico en el laboratorio	44
8.9	Detección de la resistencia en bacterias Gram positivas	53
8.10	Detección de la resistencia en bacterias Gram negativas	62
9.	Bibliografía	66
10.	Anexo	68

1. INTRODUCCIÓN

El origen de las infecciones intrahospitalarias (IIH) data del comienzo mismo de los hospitales, en el año 325 de nuestra era, cuando estas instituciones se crearon como expresión de caridad cristiana para las personas enfermas; por tanto, no es una situación nueva, sino que ha cambiado.

Entre los hombres de ciencia que se destacaron por sus aportes al conocimiento inicial de la IIH se encuentran Sir John Pringle (1740-1780), quien fue el primero que defendió la teoría del contagio animado como responsable de las infecciones nosocomiales y el precursor de la noción de antiséptico (1).

En 1843, el destacado médico estadounidense Oliver Wendell Holmes realizó el trabajo denominado *On the contagiousness of child-bed fever*, en el que postuló que las infecciones puerperales eran propagadas físicamente a las mujeres parturientas por los médicos, a partir de los materiales infectados en las autopsias que practicaban o de las mujeres infectadas que atendían; así mismo, dictó reglas de higiene en torno al parto (2).

El médico húngaro Ignacio Felipe Semmelweis publicó en 1861 sus hallazgos sobre el origen nosocomial de la fiebre puerperal, que demostraron que las mujeres cuyo parto era atendido por médicos resultaban infectadas 4 veces más a menudo que las atendidas en su casa por parteras, excepto en París, donde estas efectuaban sus propias autopsias. Este eminente médico consiguió una notable reducción

en la mortalidad materna mediante el lavado de manos por parte del personal asistencial, base fundamental en que se asienta hoy en día la prevención de la IHH (3).

Actualmente, las IHH constituyen un problema de salud mundial, no solo para los pacientes, sino también para su familia, la comunidad y el estado. Involucran a todas las instituciones hospitalarias y son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, y representan un gravamen a los costos de salud. Las complicaciones infecciosas llevan a sobrecostos debido a la prolongación de la estadía hospitalaria (4).

En Colombia, las infecciones que se presentan son una causa frecuente de enfermedad de la población debido a las malas condiciones de vida (mala nutrición, hacinamiento, mala higiene, etcétera); por tal motivo, los microorganismos que llegan al hospital son de muchas clases y, además, presentan una resistencia antimicrobiana importante; el riesgo que los pacientes, el personal de salud, de servicios generales o los visitantes adquieran una infección intrahospitalaria es evidente. Para contrarrestar este tipo de riesgo es necesario que la institución tome medidas preventivas adecuadas como son la limpieza y la desinfección, la vigilancia epidemiológica de las infecciones intrahospitalarias, y que cuente con los insumos suficientes y el recurso humano necesario (5).

Desde 2000 hasta 2003, en Bogotá se ha incrementado la notificación de las infecciones intrahospitalarias, y aparentemente los índices de la ciudad sugieren una situación controlada, ya que se encuentran por debajo de los niveles internacionales. Sin embargo, este comportamiento obedece al subregistro y no notificación del evento dentro del sistema, situación que muestra la necesidad de fortalecer el sistema de vigilancia epidemiológica en todos sus componentes (20).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Servir de apoyo en el desarrollo armónico de los laboratorios clínicos de Bogotá (área de microbiología) para alcanzar la eficiencia y la calidad de los procesos, fortalecer la vigilancia de las infecciones intrahospitalarias y la resistencia antibiótica de los microorganismos de impacto epidemiológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover el desarrollo de actividades para mejorar progresivamente el cumplimiento de los estándares óptimos de la calidad por medio de la divulgación del asunto en lo referente a infecciones intrahospitalarias y resistencia bacteriana, para que sean llevados a la práctica diaria según las normas del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)
- Desarrollar acciones para mejorar la capacidad de oferta de servicios desde los laboratorios públicos y privados en los diferentes niveles locales, desarrollando todos los procesos que lleven al uso apropiado del laboratorio (área de microbiología) en la vigilancia de infecciones intrahospitalarias y resistencia bacteriana.
- Dar a conocer a los laboratorios clínicos (área de microbiología) lo referente al programa de prevención, control y vigilancia epidemiológica de las infecciones intrahospitalarias y resistencia antimicrobiana, realizado por el Laboratorio de Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D. C.

- Apoyar el sistema de gestión de calidad del Laboratorio de Salud Pública, cumpliendo con el plan de calidad mediante el diseño, la estandarización y el mantenimiento del proceso de vigilancia de las infecciones intrahospitalarias y la resistencia bacteriana por parte del área de microbiología en el laboratorio clínico.

3. MARCO LEGAL DE LA RED DE LABORATORIOS

Las disposiciones de la ley 100 de 1993, que reformó la seguridad social en salud en Colombia, han exigido modelos de atención integral que proporcionen al individuo, a la familia y a la comunidad acciones más eficaces y oportunas de promoción de la salud, prevención de la enfermedad y atención en salud. A continuación se presentan las principales disposiciones relacionadas con la materia.

- Constitución política de Colombia
 - Artículo 48. Establece la seguridad social como un derecho irrenunciable del individuo y como un servicio público obligatorio, cuya organización debe hacerse conforme a los principios de universalidad, solidaridad y eficiencia.
 - Artículo 49. Los servicios deben ser organizados en forma descentralizada, por niveles de atención y con participación de la comunidad.
- Ley 9 de 1979, Código sanitario nacional. Establece las competencias del Estado con el medio ambiente y los factores de riesgo del consumo.
- Ley 10 de 1990. Le otorga atribuciones al estado, por intermedio del Ministerio de Salud, hoy de la Protección Social, para organizar y establecer las normas técnicas y administrativas para la prestación de los servicios de salud.
- Ley 60 de 1993. Refuerza la descentralización que inició la ley 10 de 1990. En ella se determinan las competencias de la nación, los departamentos, distritos y municipios.

- Ley 100 de 1993. Reorganiza el nuevo sistema general de seguridad social en salud, cambia la prestación de los servicios de salud, buscando garantizar los derechos irrenunciables de la persona y la comunidad.
- Decreto 812 de 1996. Por el cual se modifica la estructura y se establecen los objetivos y funciones de las dependencias de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, D. C.
- Resolución 4547 de 1998. Por la cual se definen los exámenes de laboratorio en alimentos, bebidas, medicamentos, cosméticos, insumos para la salud y productos varios de interés en salud pública que deben realizar los laboratorios de salud pública departamentales y distritales, los laboratorios clínicos y los laboratorios de citohistopatología.
- Decreto 1011 de 2006. Por el cual se establece el sistema obligatorio de garantía de calidad de la atención de salud del sistema general de seguridad social en salud. Las disposiciones de ese decreto se aplicarán a los prestadores de servicios de salud, las entidades promotoras de salud (EPS), las administradoras del régimen subsidiado (ARS), las entidades adaptadas, las empresas de medicina prepagada y a las entidades departamentales, distritales y municipales de salud.
- Resolución 1043 de 2006. Por la cual se establecen las condiciones que deben cumplir los prestadores de servicios de salud para habilitar sus servicios e implementar el componente de auditoría para el mejoramiento de la calidad de la atención y se dictan otras disposiciones. Anexo técnico 1: Manual único de estándares y de verificación de la resolución 1043 de 2006. Anexo técnico 2: Manual único de procedimientos de habilitación de la resolución 1043 de 2006.
- Decreto 2323 de 2006. Por el cual se reglamenta parcialmente la ley 9 de 1979 en relación con la red nacional de laboratorios y se dictan otras disposiciones. Tiene por objeto organizar la red nacional de laboratorios y reglamentar su gestión, con el fin de

garantizar su adecuado funcionamiento y operación en las líneas estratégicas del laboratorio para la vigilancia en salud pública, la gestión de la calidad, la prestación de servicios y la investigación.

- Decreto 3518 de 2006. Por el cual se crea y reglamenta el sistema de vigilancia en salud pública y se dictan otras disposiciones. Su objeto es crear y reglamentar el sistema de vigilancia en salud pública (Sivigila), para la provisión sistemática y oportuna de información sobre la dinámica de los eventos que afecten o puedan afectar la salud de la población, con el fin de orientar las políticas y la planificación en salud pública; tomar las decisiones para la prevención y control de enfermedades y factores de riesgo en salud; optimizar el seguimiento y evaluación de las intervenciones; racionalizar y optimizar los recursos disponibles y lograr la efectividad de las acciones en esta materia, propendiendo a la protección de la salud individual y colectiva.

Este marco legal establece las competencias del laboratorio de salud pública y la red de laboratorios en el sector de la salud.

4. MARCO TEÓRICO DEL EVENTO

4.1 DEFINICIÓN

La infección intrahospitalaria (IIH) es la que se adquiere en el hospital o clínica y es producida por microorganismos reconocibles por medio de manifestaciones clínicas o la identificación y confirmación microbiológica.

4.2 CARACTERÍSTICAS

Las características de la IIH están ligadas al agente causal, al sitio de infección y a las condiciones del huésped. Pueden ocurrir en el transcurso de la estancia ó 72 horas después del egreso del paciente, dependiendo del tiempo de hospitalización y del periodo de incubación de la enfermedad. En caso de prótesis pueden presentarse hasta doce meses después (5, 6).

Teniendo en cuenta que es una infección que no estaba presente ni se encontraba en periodo de incubación al momento del ingreso del paciente o de hacerle un procedimiento y se adquirió durante la hospitalización o como consecuencia de un procedimiento, se manifiesta en el tiempo de internación o después del egreso del paciente así:

Infección intrahospitalaria	Infección extrahospitalaria
Paciente que ingresó sano, adquirió la infección y la desarrolló en el hospital.	Paciente que ingresó infectado y sale infectado.
Ingresa infectado, se cura, adquiere una nueva infección intrahospitalaria y egresa en periodo de incubación pero desarrolla la infección por fuera del hospital.	Paciente que ingresó en periodo de incubación y desarrolló la infección por fuera del hospital.
Infección adquirida por el personal de la unidad de salud o por los visitantes, como consecuencia de contagio con otros pacientes o con desechos patógenos de la institución hospitalaria, siempre que se logre identificar la cadena de transmisión, el germen de la enfermedad y el foco institucional.	Paciente neonato que adquiere la infección en forma trans-placentaria como toxoplasmosis, sífilis, herpes y rubéola.

La infección intrahospitalaria aparece como consecuencia de la interacción agente-huésped-medio ambiente, en la que se encuentran involucradas circunstancias específicas del huésped, como la inmunodeficiencia que puede estar presentando por el estrés por la hospitalización o la patología que causó su hospitalización, del mismo modo que los procedimientos invasivos y los tratamientos inmunosupresores proporcionados a los que puede estar siendo sometido.

El agente puede estar en mayor concentración, ser resistente a los antibióticos y antisépticos comunes y ser favorecido al encontrar

alteradas las barreras anatómicas como la piel y las mucosas. Cualquier agente infeccioso puede ser el causante. Los implicados con más frecuencia son las bacterias, los bacilos Gram negativos y los cocos Gram positivos, en su orden, aun cuando también se describen IHH por hongos y virus (6).

4.3 MODO DE TRANSMISIÓN

4.3.1 *Por contacto directo*

En la que hay transferencia física directa de un microorganismo desde una persona infectada a una susceptible (persona-persona).

4.3.2 *Por contacto indirecto*

Contacto de la persona susceptible con un objeto contaminado como vendas, ropas, sondas, instrumental, monitores, pudiéndose incluir las gotas de secreciones nasales y respiratorias y los aerosoles (objeto-persona).

4.3.3 *A través de vehículos*

El germen se adquiere a través de alimentos contaminados, medicamentos y sangre.

4.3.4 *A través de vectores*

Transmisión por picadura de artrópodos y otros insectos infectados (5, 6).

4.4 FACTORES DE RIESGO

4.4.1 *Factores endógenos*

Son los relacionados directamente con el paciente; entre ellos están la disminución de las defensas a causa del estrés; las enfermedades de base con las que se ingresa al hospital; la edad; el sexo; el uso de antimicrobianos; y la alteración de barreras anatómicas como la piel y las mucosas.

4.4.2 Factores exógenos

Son los relacionados con la virulencia de la cepa; los pertenecientes a la institución basados en el cumplimiento de protocolos y de las normas de bioseguridad; la planta física y su mantenimiento; las capacitaciones al personal, su volumen y rotación (6).

4.5 COMPETENCIAS DEL LABORATORIO EN LA VIGILANCIA DE LAS IIH Y LA RESISTENCIA BACTERIANA

- Vigilar el cumplimiento de las normas sobre salud ocupacional y bioseguridad, que deben cumplirse estrictamente en el laboratorio de microbiología.
- Participar en las reuniones ordinarias y extraordinarias del comité de infecciones.
- Analizar y divulgar la información microbiológica y de resistencia bacteriana en un condensado mensual, como apoyo al programa de vigilancia epidemiológica a cargo del comité de infecciones que facilite la toma de decisiones frente a la prevención y el control de las IIH y la resistencia bacteriana.
- Participar en las capacitaciones del personal hospitalario y en los eventos realizados por el comité de IIH.
- Hacer cultivos de pacientes, personal de salud, personal de oficios generales, instrumentos o de superficies ambientales, o el cultivo que se requiera para el estudio de posible colonización, o para la búsqueda de posible foco de infección responsable del brote.
- Identificar los microorganismos responsables de las infecciones intrahospitalarias de acuerdo con el sistema de referencia que rige los laboratorios de microbiología (CLSI).
- Apoyar al comité de IIH en todos los aspectos relacionados con la confirmación diagnóstica por laboratorio del paciente infectado en el hospital, igual que en la toma y la remisión de muestras.
- Solicitar a la entidad los insumos necesarios para hacer en el laboratorio (área de microbiología) la vigilancia, la prevención y el control de las IIH y resistencia antibiótica.

- Informar de inmediato los resultados de microorganismos epidemiológicamente importantes y resistencias bacterianas inusuales a la entidad (6).

4.6 NORMAS MÍNIMAS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EN LA VIGILANCIA DE RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia bacteriana es un asunto de importancia en salud pública; su presencia mundial, el surgimiento de resistencia bacteriana a nuevos agentes antimicrobianos y la aparición de patógenos relacionados con enfermedades prevalentes como las infecciones respiratorias, la enfermedad diarreica aguda y las infecciones intrahospitalarias, le dan el carácter de problema prioritario. Por ello, el conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana debe dirigirse a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces. Además, la información proporcionada por la vigilancia debe servir de insumo para la elaboración de un programa de uso racional de antibióticos.

De acuerdo con esto, la vigilancia de la resistencia antimicrobiana es indispensable, siendo necesario asegurar la calidad de los resultados del laboratorio. Para esto se recomienda la estandarización de los procedimientos, el desarrollo de normas técnicas, la actualización y capacitación del personal de los laboratorios, la supervisión mediante el control de calidad interno y contar con un programa de control de calidad externo.

La labor desempeñada en el laboratorio y el trabajo clínico en conjunto lograrán el uso racional de antibióticos, lo que se reflejará en ganancias para el paciente y para la institución (3, 4, 5, 6).

En 2001, la Organización Mundial de la Salud (OMS) presentó una estrategia global para lograr contener el problema de la resistencia antibiótica, y formuló recomendaciones metódicas, precisas y claras, con prioridad a las medidas de gran impacto. Según la OMS, algunos de los factores que han contribuido al desarrollo del problema de la resistencia antibiótica son:

- La falta de legislación que regule el uso de los antibióticos y obligue a cumplir las normas vigentes.
- La prescripción de antibióticos por personas no calificadas para tal función.
- La venta no controlada de antibióticos.
- Su prescripción indiscriminada por profesionales calificados para recetar.
- La utilización errónea o exagerada de antibióticos en clínicas y hospitales
- El incumplimiento de los pacientes a las dosis del tratamiento establecido, ya sea en tiempo o dosis.
- La automedicación por parte de pacientes mal informados (7).

Actualmente, el uso indiscriminado de antibióticos afecta a la comunidad y en los hospitales, observándose el aumento de costos en la atención y, más grave aún, la aparición de gérmenes multirresistentes con las complicaciones asociadas a su presencia (8). En Colombia son pocos los estudios que evalúan el impacto del uso de antibióticos en los hospitales y las estrategias para su control, y no se halla información publicada sobre el impacto de las medidas tomadas con respecto a la resistencia antimicrobiana y a los costos de la atención, con la excepción de la experiencia de Pérez y col. (9). Sin embargo, si se observan los altos perfiles de resistencia encontrados en los hospitales colombianos se puede concluir el uso inadecuado de antibióticos.

Arias y col. (10) evaluaron la resistencia de Gram positivos en hospitales colombianos y obtuvieron los siguientes resultados: *S. aureus* meticilino resistentes (SAMR) en 56%; y *Enterococcus* vancomicino resistente (EVR) 9,7%. Cortés y col. (11) hicieron un estudio durante tres años a los perfiles de resistencia de quince hospitales de Bogotá. Además de la confirmación de la alta tasa de resistencia observada de SAMR (41-49%) anotan el aumento preocupante en la resistencia de gérmenes Gram negativos como *Pseudomonas* resistentes a imipenem (21-31%) y *Klebsiella spp.* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

4.6.1 Mecanismos de resistencia de los microorganismos de impacto epidemiológico

4.6.1.1 Modificación de sitios de unión en la molécula blanco

Microorganismos	Mecanismo de resistencia	Modo de acción	Antibióticos que inactiva
<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. faecium</i>	Modificación de enzimas blanco	Producción de enzimas PBP con poca afinidad por el antibiótico o inducción de las mismas	Oxacilina, Penicilina
<i>S. aureus</i> , <i>S. sanguis</i> ,	Modificación de sitios de unión de ribosomas	Alteración del sitio de unión en los ribosomas	Aminoglucósidos, tetraciclina, macrólidos y lincosaminas
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> ,	Modificación de los precursores de la pared celular	Alteración del sitio de unión de glicopéptidos a partir de la proteína producida por el gen vanA	Vancomicina

4.6.1.2 Inhibición enzimática

Microorganismos	Mecanismo de resistencia	Modo de acción	Antibióticos que inactiva
<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterobacterias</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i>	Presencia de enzimas que alteran aminoglucósidos	Alteración de aminoglucósidos por <i>O</i> -fosforilación, <i>O</i> -nucleotidilación o por <i>N</i> -acetilación	Aminoglucósidos
Gram positivos, Gram negativos y anaerobios	Presencia de <i>B</i> -lactamasas	Rompen el anillo <i>B</i> -lactámico	<i>B</i> -lactámicos
<i>Escherichia coli</i>	Presencia de eritromicina esterasa	Hidrólisis del anillo lactona	Eritromicina
Gram positivos y Gram negativos	Presencia de Acetiltransferasa de cloramfenicol	Inactiva el cloramfenicol por una 3- <i>O</i> -acetilación	Cloramfenicol

4.6.1.3 Eliminación activa del antibiótico de la célula

Microorganismos	Mecanismo de resistencia	Modo de acción	Antibióticos que inactiva
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterobacterias</i> , <i>Escherichia coli</i>	Eliminación activa del antibiótico de la célula	Disminución en la acumulación del antibiótico en la célula mediante canalización realizada por proteína dependiente de ATP	Quinolonas, macrólidos, tetraciclinas

4.6.1.4 Restricción de la entrada del antibiótico a la célula

Microorganismos	Mecanismo de resistencia	Modo de acción	Antibióticos que inactiva
<i>S. marcescens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Alteración de porinas	Presencia de porinas restrictivas al paso de los antibióticos	Quinolonas, B-lactámicos

4.7 EL PROGRAMA WHONET

En septiembre de 2001, al declarar la resistencia bacteriana como problema de salud pública, la Organización Mundial de la Salud presentó una estrategia global para apoyar el trabajo frente a la resistencia antibiótica, que incluyó la libre distribución del programa WHONET, diseñado por los profesores John Stelling y Tomas O'Brien, de la Universidad de Harvard.

El objetivo principal del programa es trabajar en el control de las infecciones mediante la supervisión de la resistencia bacteriana en los hospitales y la comunidad. Además, es un medio que facilita el análisis de la información interna de cada entidad, la formación de redes de vigilancia externas; en el laboratorio que esté haciendo pruebas microbiológicas por sistema automatizado se pueden convertir datos del formato del sistema al formato de WHONET usando el programa Baclink (12).

La Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, considerando la importancia de las IHH y la diseminación de la resistencia bacteriana,

diseñó en 1999 el sistema de información de IIH en Bogotá, y en 2000 inició su funcionamiento el Comité distrital de infecciones intrahospitalarias. En el año 2002 se conformó el Grupo para el control de la resistencia antimicrobiana en Bogotá (Grebo), liderado por la Universidad Nacional de Colombia.

Finalmente, en 2004, y como un llamado a la acción mediante el compromiso de los diferentes actores del sistema, para que en conjunto se mejoren las condiciones en salud a los usuarios y personal de la salud, propiciando escenarios enmarcados en la calidad que repercuta en la satisfacción y bienestar de la comunidad, se publica la política de prevención y vigilancia epidemiológica de IIH en Bogotá.

5. RED DISTRITAL DE LABORATORIOS

La vigilancia por el laboratorio es un sistema basado en la notificación periódica y sistemática de la información generada por los laboratorios clínicos y de salud pública y por los laboratorios de referencia; todos ellos constituyen una red de notificación voluntaria y obligatoria según el evento. Su objetivo es aportar información específica para la vigilancia, que complemente la procedente de los sistemas generales, y contribuir al conocimiento de las enfermedades de interés en salud pública para la toma oportuna de decisiones.

El área de infecciones intrahospitalarias del Laboratorio de salud pública de Bogotá tiene especial interés en que la vigilancia de los microorganismos de impacto epidemiológico y la resistencia anti- biótica se haga en forma eficiente. La capacitación continua de los profesionales y técnicos que procesan las muestras es uno de los aspectos indispensables para garantizar la identificación correcta por el laboratorio. Con ello se logra que el laboratorio confirme el diagnóstico de dichas patologías, asegurar su calidad y fortalecer el sistema de información desde el nivel local, lo que permitirá que esta información llegue a todas las entidades interesadas (6, 13).

Además, por medio de la vigilancia de estos patógenos por el laboratorio es posible conocer el patrón de susceptibilidad antimicrobiana, la evolución y la aparición de resistencia a nuevos antibióticos, así como los serogrupos, serotipos y subtipos que circulan en Bogotá, datos importantes para caracterizar fenotípicamente el agente etiológico y definir las intervenciones en salud pública.

Para que la vigilancia sea eficiente y oportuna se deben definir claramente las acciones que debe hacer cada uno de los laboratorios de la red de acuerdo con su nivel de complejidad, lo cual permitirá que la vigilancia sea eficiente y oportuna (6, 13).

En relación con la vigilancia de las infecciones intrahospitalarias y la resistencia antibiótica. El Laboratorio de Salud Pública, área de IHH considera que los microorganismos que deben ser vigilados son:

1. *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (hospitalario y en la comunidad).
2. *Staphylococcus coagulasa* negativo meticilino resistentes.
3. *Staphylococcus aureus* con sensibilidad intermedia a vancomicina. – *S. aureus* resistente a vancomicina.
4. *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina.
5. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina.
6. *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina.
7. *Klebsiella pneumoniae* BLEES positiva.
8. *Klebsiella oxytoca* BLEES positiva.
9. *Escherichia coli* BLEES positiva.
10. *Pseudomona aeruginosa* resistente a Carbapenémicos.
11. *Acinetobacter baumannii* resistente a Carbapenémicos.
12. Enterobacterias resistentes a Carbapenems.

5.1 RESPONSABILIDAD POR NIVELES

5.1.1 Instituciones prestadoras de salud

- Diagnóstico

Los laboratorios clínicos de las instituciones públicas y privadas deben realizar el diagnóstico de las patologías en las que están involucrados los patógenos mencionados.

- Informe

Cuando obtenga un resultado positivo para cada uno de los patógenos mencionados, el laboratorio clínico debe informar al médico tratante, al paciente y al comité de infecciones o a la oficina de epidemiología de la entidad hospitalaria donde se encuentre el paciente.

- Remisión del aislamiento

Los laboratorios clínicos de las entidades públicas y privadas deben remitir los aislamientos de los patógenos antes mencionados al área de IHH del Laboratorio de salud pública para confirmación. El aislamiento debe ser viable, sin contaminación y estar acompañado de la información epidemiológica: demográfica, procedencia, fuente y diagnóstico (13).

5.1.2 Laboratorio de salud pública

- Confirmación del aislamiento

El Laboratorio de salud pública debe confirmar la identificación de los patógenos antes mencionados para asegurar la calidad del diagnóstico.

- Capacitación

Con el fin de impartir y homologar conocimientos en lo relacionado con los procesos de análisis y gestión de calidad en los eventos de interés en salud pública. Se realizan actividades con el fin de adquirir habilidades, se resuelven inquietudes y se actualiza.

- Asistencia técnica

Se realizará por medio de dos modalidades:

- *Evaluación directa del desempeño.* En las que se evaluarán las fortalezas, las debilidades, las medidas correctivas y las recomendaciones para mejorar el desempeño del laboratorio. Debe contar con seguimiento de los compromisos.

- *Asesoría.* En el diagnóstico, las técnicas y los procedimientos de los eventos de interés en salud pública, resolviendo rápida y acertadamente las inquietudes técnicas. Puede ser resultado de una llamada telefónica, un correo electrónico o convencional o consulta personalizada. Estará disponible de forma permanente y debe ser registrada en matrices elaboradas para tal fin.

- Referencia

Con esta actividad se confirmarán los diagnósticos de los laboratorios y se responderá, por escrito, a la solicitud, denominada contrarreferencia. Debe estar disponible de forma permanente (6, 13).

6. BIOSEGURIDAD

Como resultado de accidentes o incidentes no reconocidos, el personal del laboratorio de microbiología que trabaja con agentes infecciosos puede adquirir infecciones en el laboratorio. El grado de riesgo depende, sobre todo, de la virulencia del agente biológico en cuestión y de la resistencia del huésped.

En el laboratorio, las infecciones se adquieren por ingestión, inhalación o introducción de microorganismos en los tejidos de manera inadvertida. Las prácticas en la cabina de bioseguridad nivel 2 son apropiadas para el trabajo con estos agentes, que presentan un peligro moderado para el personal y el ambiente.

En relación con el personal de laboratorio que trabaja bajo estas condiciones de GBN-2, se han establecido los siguientes requisitos.

6.1 REQUISITOS PARA BIOSEGURIDAD EN MICROBIOLOGÍA

- El personal de laboratorio debe recibir adiestramiento específico en cuanto al manejo de los agentes patógenos, y estar dirigido por profesionales competentes.
- El acceso al laboratorio se debe limitar a las horas de trabajo y al personal autorizado. Allí no deben entrar familiares ni amigos.
- Deben tomarse precauciones extremas con respecto a los objetos afilados contaminados.
- El personal que realiza ciertos procedimientos que requieren la creación de aerosoles infecciosos o salpicaduras debe utilizar equipo y ropa de protección adecuados.

- Las pruebas se deben hacer de manera cuidadosa para minimizar las salpicaduras o la formación de aerosoles; se deben evitar las técnicas que tienden a producir aerosoles.
- Las agujas o asas de inoculación se deben enfriar sosteniéndolas en el aire durante 5-10 segundos antes de que toquen las colonias o el material clínico.
- Las asas que contienen material infeccioso deben secarse en aire caliente sobre un mechero antes de flamearlas.
- Los recipientes que se colocan en la máquina vórtex y los que deben ser centrifugados deben estar cerrados. Si no hubiera disponibles tubos con cierre de seguridad, habrá que utilizar tubos sellados.
- Se debe usar gasa para sacar las tapas de las muestras de sangre; también debe ponerse gasa alrededor de la tapa del frasco de hemocultivo para reducir al mínimo la producción de aerosol cuando se retira la aguja.
- Nunca se deben cortar las agujas ni sacar las jeringas antes de que se pasen por la autoclave.
- Todos los líquidos corporales deben ser centrifugados en contenedores con tapas de seguridad, exclusivamente.
- Cuando se lleven a cabo procedimientos con alto riesgo de generar aerosoles infecciosos o cuando el procedimiento que se utiliza puede resultar en una salpicadura de la cara con material infeccioso u otro material peligroso, el trabajo de laboratorio debe hacerse en cabinas de seguridad o por laboratoristas que usen los equipos apropiados de protección de la cara, por ejemplo, anteojos, máscara u otros protectores.

6.2 DESCONTAMINACIÓN DE LOS MESONES DE TRABAJO Y OTRAS SUPERFICIES

- Después de haber trabajado con agentes infecciosos o muestras clínicas o después de derrames, salpicaduras u otra contaminación por materiales infecciosos, los mesones de trabajo se deben limpiar, siempre, con un desinfectante (un desinfectante fenóli-

co, hipoclorito de sodio al 1% [lejía] o alcohol isopropílico al 70%).

- Las soluciones desinfectantes deben mantenerse en la estación de trabajo.

6.3 DISPOSICIÓN DE LOS MATERIALES CONTAMINADOS

- Todos los desechos, tales como placas, tubos, muestras clínicas y otros materiales contaminados desechados deben colocarse en recipientes que deberán estar disponibles en cada banco de trabajo.
- Para reducir el riesgo al mínimo habrá que usar cajas especiales para desechar objetos punzantes o afilados, por ejemplo, jeringas o cristales rotos.
- Se debe evitar la sobrecarga de estos recipientes de desechos, que deben ser transportados cuidadosamente al cuarto donde esté la autoclave y pasados por esta antes de eliminarlos.

6.4 AUTOCLAVE

- Los laboratorios deben disponer de una autoclave que sea operada sólo por personal capacitado para este fin.
- Para verificar que cada autoclave esté trabajando apropiadamente debe incluirse regularmente en su carga una tira de esporas u otros indicadores biológicos designados para probar la eficiencia de la esterilización.
- Cada carga de la autoclave debe ser monitoreada con cinta sensible a la temperatura (testigo), termógrafo u otros medios, por ejemplo, indicadores biológicos.

6.5 PRÁCTICAS ESPECIALES

6.5.1 *Transporte de materiales de riesgo biológico*

- El transporte de materiales de riesgo biológico aumenta el riesgo de roturas y derrames.
- Si el transporte es necesario, el recipiente primario del agente

infeccioso (independientemente de su tamaño) debe ponerse en un contenedor secundario irrompible y que pueda ser sellado, por ejemplo, con una tapa cerrada con tornillos o una bolsa plástica.

6.5.2 Desinfectantes

La susceptibilidad de los microorganismos a los desinfectantes varía. El alcohol al 70% generalmente es eficaz como desinfectante de superficie en el caso de *Enterobacteriaceae*, pero hay otros microorganismos más resistentes a ese compuesto. No obstante, el alcohol isopropílico al 70% no es el desinfectante de elección para la descontaminación de los derrames. Los desinfectantes fenólicos, aun cuando son caros, por lo regular son eficaces contra muchos microorganismos.

Lea siempre las etiquetas de los desinfectantes y siga las recomendaciones del fabricante en cuanto a la dilución y el tiempo de exposición necesario para que sean eficaces, especialmente antes de utilizar contra los microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis*.

Una dilución de 1:100 (1%) de un blanqueador doméstico, hipoclorito de sodio en agua, es un desinfectante general efectivo. Esta dilución se puede utilizar para limpiar las superficies de los mesones o bancos, campanas y otros equipos.

Una dilución de 1:10 (10%) de hipoclorito es corrosiva y deteriorará el acero inoxidable, por lo que no debe utilizarse rutinariamente; sin embargo, esta solución se puede usar para limpiar los derrames de cultivos o material infeccioso concentrado con fuerte contaminación.

Si el hipoclorito de sodio se utiliza como desinfectante las diluciones estándar al 1% deben prepararse diariamente, partiendo de una solución patrón.

6.5.3 Descontaminación de derrames

Para la descontaminación de derrames se recomiendan los siguientes procedimientos:

- Aísle el área para prevenir el ingreso de personas ajenas.

- Use guantes y ropa protectora, por ejemplo, un delantal o una bata de laboratorio, zapatos y una máscara (si lo que se ha derramado puede contener un agente respiratorio o si el agente es desconocido).
- Absorba o cubra el material derramado con toallas desechables.
- Sature las toallas con un desinfectante de nivel alto o intermedio apropiadamente diluido, por ejemplo, una formulación fenólica o hipoclorito.
- Ponga toallas empapadas en desinfectante sobre el área y déjelas en el lugar por lo menos por 15 minutos antes de sacarlas y eliminarlas.
- Limpie el área utilizando toallas empapadas en desinfectante y deje que el aire seque el área.
- Ponga todos los materiales desechables utilizados para la descontaminación del derrame dentro de un recipiente para riesgos biológicos.
- Manipule el material de la misma forma que otros desperdicios infecciosos.
- El personal del laboratorio debe participar en el cumplimiento de las normas de seguridad.
- Todas las áreas deben estar marcadas con las señales de riesgo biológico y su nivel de contención.
- Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas para mantener la adecuada contención biológica.
- Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente y siempre que se produzca un derrame.
- Los residuos y muestras peligrosas que van a ser incinerados fuera del laboratorio deben ser transportados en contenedores cerrados, resistentes e impermeables, siguiendo las normas específicas para cada tipo de residuo.
- El laboratorio debe permanecer limpio y ordenado y no es aconsejable utilizar los pasillos como almacén.
- Para evacuar el laboratorio en caso de emergencia siempre debe haber un espacio libre no inferior a 120 cm.

- El transporte de las muestras dentro o entre laboratorios se hará de tal manera que, en caso de caída, no se produzcan salpicaduras. Lo recomendable es hacerlo en cajas herméticas o neveras transportables. Estas cajas o neveras deberán ser rígidas y resistentes a los golpes, contar con materiales absorbentes en su interior y de fácil desinfección. Se etiquetarán o identificarán de forma oportuna y no podrán ser utilizadas para otros fines. Bajo ningún concepto se deben transportar las muestras en la mano.
- La ropa protectora, fácilmente ajustable y confortable, así como guantes, gafas, etcétera, debe estar disponible en todo momento.
- La ropa protectora de las áreas con nivel de contención 3 (batas) nunca debe ser usada fuera del área de trabajo y si se quita se debe desechar inmediatamente en una bolsa de material contaminado. Jamás debe volver a ser usada.
- Todo el personal debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Con este fin deben usarse guantes cuando se manipulen muestras o cultivos que contengan posibles patógenos. Los guantes siempre serán desechados antes de salir del área de trabajo. Jamás se saldrá de la misma con los guantes puestos ni con ellos se cogerá el teléfono, se tocarán las hojas de examen, maniguetas de las puertas, etcétera.
- Tras quitarse los guantes se hará un lavado de manos.
- Se usarán gafas protectoras y mascarillas faciales si existe riesgo de salpicaduras o aerosoles.
- Se pondrá extremo cuidado en minimizar el riesgo de autoinoculación y de generación de aerosoles.
- Los derrames y accidentes deben ser informados inmediatamente al supervisor y al jefe del laboratorio y hacerse constar por escrito.
- Nadie podrá trabajar en el área de tuberculosis con una prueba de tuberculina negativa.
- Está prohibido pipetear con la boca. Se hará pipeteo automático

con material adecuado y cada trabajador será instruido para manejarlo debidamente.

- En la zona de trabajo no debe colocarse material de escritorio ni libros, ya que el papel contaminado es de muy difícil esterilización.
- No deberán usarse lentes de contacto.
- El personal con el cabello largo debe llevarlo recogido.
- Está prohibido comer, beber, fumar y aplicarse cosméticos en el área de trabajo del laboratorio, así como almacenar comida o bebida.
- El personal debe lavarse las manos frecuentemente durante las actividades rutinarias, tras acabar la jornada laboral y siempre antes de abandonar el laboratorio (almorzar). Se usará un jabón antiséptico y el secado se hará con papel.
- Las heridas y los cortes en las manos, si se han producido en el Laboratorio, serán comunicados al responsable de la sección correspondiente, así como al supervisor de bioseguridad, que lo registrará haciendo constar todas las circunstancias. Las heridas y cortes deben ser vendados convenientemente, y después es imprescindible ponerse guantes.

6.6 ELIMINACIÓN DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

La gestión de residuos debe ser considerada como una parte muy importante de la seguridad en el laboratorio de microbiología. Muchos de los desechos que se generan pueden estar contaminados por microorganismos o contener sustancias químicas tóxicas y peligrosas. En menor medida, el personal del laboratorio puede estar expuesto a los efectos de las radiaciones ionizantes.

Los casos de infecciones o intoxicaciones en el laboratorio son conocidos desde antiguo, lo que obliga a la adopción de medidas de protección para la persona que trabaja en este ámbito. La protección debe ampliarse con prácticas tendientes a preservar la salud de los compañeros de trabajo. Además, aun cuando la visión que aquí se

pretende dar está encaminada, sobre todo, a la protección del personal de los laboratorios, es necesario recordar que las actividades que se realizan en ellos pueden afectar a la salud comunitaria.

La mejor manera de racionar los residuos es mediante una gestión integrada, cuyos pilares básicos son la minimización, la segregación y la eliminación controlada (disposición). El personal del laboratorio debe ser consciente de que la puesta en marcha de normas de buena práctica en la gestión de los residuos repercute sobre su salud y la de los que lo rodean, y contribuye a reducir costos.

De una forma conceptual, podemos considerar que un residuo infeccioso es todo aquel material capaz de producir una enfermedad infecciosa. Sin embargo, a diferencia de los residuos químicos y radiactivos, los desechos infecciosos y sus riesgos asociados no pueden ser identificados objetivamente.

La posibilidad de contraer infecciones en el laboratorio por medio de los cultivos microbiológicos desechados o tras una punción o herida accidental es bien conocida. No ocurre lo mismo a la hora de evaluar el riesgo que las actividades del laboratorio puedan tener sobre la salud de la comunidad. Por ejemplo, no existen evidencias epidemiológicas que asocien las infecciones en la comunidad con los residuos hospitalarios, de la misma manera que no se ha demostrado que los desechos de los hospitales tengan más capacidad infecciosa que los residuos urbanos generales.

Es necesario tener en cuenta aspectos epidemiológicos como la vía de transmisión, la puerta de entrada, la virulencia del patógeno y la susceptibilidad del huésped, entre otros. A pesar de todo, la mayor extensión y gravedad de hipotéticos brotes, la alarma social que crearía y razones de tipo estético obligan a un tratamiento particular de los residuos infecciosos antes de ser eliminados como residuos urbanos.

Se recomienda que todo laboratorio de microbiología elabore un manual o protocolo para la gestión de estos residuos, siguiendo las directrices generales contenidas en el plan de residuos de cada institución. Esta recomendación puede ser norma obligada en el caso

de que el laboratorio pretenda certificarse o acreditarse. Entre los diferentes aspectos que debe contener dicho manual se pueden citar los siguientes:

- Estrategias de minimización de los residuos, incluyendo la reducción en origen.
- Separación de los residuos infecciosos de los no infecciosos.
- Identificación y tipificación de los residuos infecciosos y su riesgo relativo.
- Normas de señalización, rotulación, almacenamiento y transporte.
- Plan de formación de todas las personas expuestas a estos residuos.
- Normas de actuación en caso de vertidos o roturas accidentales.
- Plan de contingencia ante el fallo de las medidas de contención habituales (14, 15).

7. CONTROL DE CALIDAD DEL EVENTO

7.1 INSTITUCIONES PRESTADORAS DE SERVICIOS DE SALUD

Los laboratorios clínicos públicos y privados deben llevar a cabo acciones que aseguren que los resultados, los productos y los servicios puedan ser entregados. Estas acciones deben estar encaminadas hacia el control de calidad interno y externo.

Para verificar la calidad del producto final, los laboratorios clínicos públicos y privados deben participar en las siguientes actividades.

7.1.1 Control de calidad interno

Conjunto de medidas adoptadas durante la ejecución de cada prueba para comprobar la calidad de los resultados. Deben ser sistemáticas y continuas para permitir, simultáneamente, medir la exactitud y precisión de las pruebas, la calidad de los equipos, los instrumentos y los reactivos, el desempeño del personal y el control de los resultados, previo a su emisión.

En el área de microbiología del laboratorio clínico se recomienda realizar y registrar en su formato correspondiente los siguientes controles, entre otros:

- De calidad de coloraciones.
- De mantenimiento de equipos.
- De la temperatura de las neveras e incubadoras.
- De calidad de medios de cultivo y reactivos.
- Manual de procedimiento que incluya toma de muestras, transporte de muestras, técnicas y procedimientos.

7.1.2 Control de calidad externo

- *Evaluación externa directa del desempeño (EED).*

Prueba de idoneidad

Durante este proceso se deben diagnosticar las cepas-problema enviadas por el laboratorio central que evaluará la idoneidad del diagnóstico. Es un sistema retrospectivo, periódico y objetivo de los resultados de diferentes laboratorios. Con esta actividad se garantiza la optimización de los procedimientos y resultados de los laboratorios pertenecientes a la red distrital, acreditándolos en el diagnóstico.

El programa consiste en el envío de, por lo menos, dos pruebas anuales con aislamientos incógnitos, que cada laboratorio destinatario debe identificar y determinar el patrón de susceptibilidad a los antibióticos. El laboratorio de referencia recibe los resultados y elabora un informe detallado que remite a cada uno de los participantes, en el que describe los resultados de la identificación y pruebas de susceptibilidad, además una serie de indicadores sobre el mejoramiento de la calidad. Estos indicadores permiten a los participantes conocer los avances logrados y sirven de estímulo para continuar mejorando la calidad del diagnóstico.

- *Evaluación externa indirecta del desempeño (EEID).*

Supervisión indirecta

Los laboratorios clínicos públicos y privados deben enviar un porcentaje determinado de cepas (5%) al laboratorio de salud pública, que hará la evaluación retrospectiva. El laboratorio participante debe haber sido capacitado con anterioridad en los eventos supervisados y, por tanto, hacer parte de la red de laboratorios

- *Auditoría*

Incluye dos aspectos: 1) un control de conformidad, que consiste en averiguar si las disposiciones aplicadas corresponden a las disposiciones preestablecidas; y 2) un control de coherencia para averiguar si las disposiciones desarrolladas son idóneas, eficaces y eficientes, y permiten lograr los objetivos definidos en términos de calidad. Se evalúa la concordancia entre lo teórico correcto y

su implementación práctica. Este tipo de evaluación establece un diagnóstico que permite identificar las fortalezas y las debilidades del laboratorio para proponer acciones de mejoramiento que toman en cuenta el contexto técnico, económico y humano. El diagnóstico se hace mediante una encuesta que cubre todas las etapas de intervención. Sobre el mismo modelo, el jefe del laboratorio puede proceder con una auditoría interna de su propio laboratorio, verdadera autoevaluación del desempeño de su unidad con una frecuencia determinada. La auditoría debe respetar el principio de independencia. Para garantizar el examen objetivo de la situación, los auditores (expertos reconocidos en el campo) deben ser independientes, imparciales, y no tener una relación directa con la institución supervisada (13).

7.2 LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA

7.2.1 *Evaluación externa indirecta del desempeño*

Es la evaluación retrospectiva del diagnóstico de rutina a un porcentaje determinado de muestras. Para su planeación se deben tener en cuenta las siguientes características:

- El laboratorio participante debe haber sido capacitado con anterioridad en los eventos supervisados y, por tanto, hacer parte de la red de laboratorios.
- La actividad se programará según resultado o necesidad del servicio.
- El porcentaje se planeará de acuerdo con el evento.
- Envío de cepas con formato diligenciado.
- Evaluar la concordancia y proporcionar apoyo técnico mediante un informe escrito.
- Cuando exista discordancia entre el primer y segundo evaluador se debe introducir un tercero.
- El laboratorio supervisor debe diseñar un plan con medidas correctivas: capacitación, reentrenamiento o asistencia técnica.

7.2.2 *Evaluación externa directa del desempeño (en proceso)*

Se hará mediante el envío de muestras problema a los laboratorios que hagan parte de la red distrital. Evaluará la idoneidad del diagnóstico. Es un sistema de comparación retrospectivo, periódico y objetivo de los resultados de diferentes laboratorios. Con esta actividad se garantiza la optimización de los procedimientos y resultados de los laboratorios pertenecientes a la red distrital, acreditándolos en el diagnóstico. Debe tener las siguientes características:

- Se desarrolla mediante envío de muestras problema.
- Remisión de historia clínica.
- Respuesta en 30 ó 45 días, de acuerdo con el evento.
- Evaluación de la concordancia y oportunidad del diagnóstico.
- Retroalimentación: 30 días siguientes al cierre.
- Frecuencia: dos veces al año.
- Análisis de resultados: concordancia general, concordancia de especie, etcétera.
- El informe debe tener el resultado individual y global con las recomendaciones.
- Medidas correctivas: el LSP documentará la medida correctiva, que se enviará al laboratorio participante para implementar un plan de fortalecimiento (capacitación o visita de supervisión). Hacer análisis cruzado con EEID.

7.2.3 *Supervisión directa*

Es una evaluación formalizada efectuada por el nivel central o superior hacia el nivel periférico (supervisión de los laboratorios de nivel 2 por el laboratorio referencial de nivel 3, o supervisión de los laboratorios de nivel 1 por el nivel 2). Este tipo de evaluación permite medir la adecuación del sistema de calidad con respecto a la política de *calidad* de la institución y a sus objetivos en la red. Es una forma de observación directa del desempeño.

La modalidad de la supervisión directa se organiza por miembros de la institución central o superior, y responde a criterios presta-

blecidos, basados en entrevistas con el personal, apreciación directa del desempeño y evaluación de necesidades. Se debe programar y ejecutar sistemáticamente (13).

8. PROCEDIMIENTO TÉCNICO

8.1 PROGRAMA DE INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS Y RESISTENCIA BACTERIANA

8.1.1 Misión del programa

El programa de infecciones intrahospitalarias es consecuente con la misión institucional de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá de crear condiciones para mejorar el nivel de vida de la población. Apoyará a los laboratorios clínicos (área de microbiología) mediante el control de calidad, la asesoría, la vigilancia, la capacitación y la investigación, con el fin de hacer el seguimiento y el control de las infecciones intrahospitalarias y la resistencia antibacteriana de los microorganismos de impacto epidemiológico, cumpliendo con los estándares de la CLSI.

8.1.2 Visión del programa

A corto y mediano plazo, el programa de infecciones intrahospitalarias se ve como un área líder en el desarrollo de procesos de seguimiento y control de las infecciones intrahospitalarias y resistencia bacteriana, apoyando a los laboratorios públicos y privados (área de microbiología) en el desarrollo de pruebas analíticas precisas, exactas y validadas.

8.1.3 Alcance del programa

Tiene por objeto asegurar y mejorar continuamente el seguimiento y el control de las infecciones intrahospitalarias en Bogotá por parte

de los laboratorios clínicos (área de microbiología) de clínicas y hospitales públicos y privados.

8.1.4 Estrategias del programa

- Control de calidad.
- Capacitación, asesoría y asistencia técnica.
- Investigación.

8.2 PRUEBAS QUE REALIZA EL LABORATORIO DE LA SECRETARÍA DISTRITAL DE SALUD A LOS MICROORGANISMOS DE IMPACTO EPIDEMIOLOGICO

8.2.1 *Staphylococcus aureus metilino resistente (SAMR)*

- Identificación de género y especie por método manual.
- Identificación de género, especie y resistencia antibiótica por sistema automatizado.
- Prueba manual con disco de Cefoxitin y oxacilina.
- Prueba D.
- MIC manual para *S. aureus* vancomicina resistente y resistencia intermedia a vancomicina.

8.2.2 *Staphylococcus coagulasa negativo metilino resistente (SCNMR)*

- Identificación de género y especie de forma manual.
- Identificación de género, especie y resistencia antibiótica por sistema automatizado.
- Prueba manual con disco de Cefoxitin y oxacilina.
- Prueba D.

8.2.3 *Enterococcus faecalis - Enterococcus faecium resistentes a vancomicina*

- Identificación de género y especie de forma manual.
- Identificación de género, especie y resistencia antibiótica por sistema automatizado.
- Prueba con disco de vancomicina.
- PCR en tiempo real (en proceso).

8.2.4 *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* BLEES positiva

- Identificación de género y especie de forma manual.
- Identificación de género, especie y resistencia antibiótica por sistema automatizado.
- Prueba tamiz de BLEES manual.
- Prueba confirmatoria de BLEES manual.
- Prueba de inducción Amp C.

8.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*

- Identificación de género y especie de forma manual.
- Identificación de género, especie y resistencia antibiótica por sistema automatizado.
- Prueba con disco de cefoperazona-sulbactam u otro antibiótico que se requiera en forma manual.
Prueba para comprobar resistencia a Carbopenémicos.

8.2.6 *Enterobacter* sp. y *Serratia* sp.

- Identificación de género y especie por sistema automatizado.
- Prueba de inducción Amp C.

8.3 ENVÍO DE LAS MUESTRAS DE LOS HOSPITALES O CLÍNICAS AL LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA DE LA SECRETARÍA DISTRITAL DE SALUD

- Existe un formato creado para el envío de las cepas provenientes de infecciones intrahospitalarias (véase el Anexo).
- Los laboratorios de clínicas y hospitales de la red enviarán 5% de cepas mensuales, catalogadas como infecciones intrahospitalarias o de microorganismos que presenten alguna resistencia.

8.4 SEGUIMIENTO DE BROTES

- Se hará visita y se formularán recomendaciones de sitios de toma de muestras.
- Se confirmarán todas las cepas obtenidas pertenecientes al brote.
- Se interpretarán los resultados y se presentarán sugerencias.
- Se hará seguimiento del evento.

8.5 ESTUDIOS DE RESISTENCIA

Estudio de algún microorganismo de impacto epidemiológico o no que presente un comportamiento no esperado.

- Se identifica de forma manual y automatizada.
- Se estudia la resistencia.
- Se hacen pruebas adicionales.

8.6 CAPACITACIÓN, ASESORÍA Y ASISTENCIA TÉCNICA

Se prestará en los siguientes aspectos:

- Identificación de los microorganismos.
- Identificación de resistencia antimicrobiana.
- Pruebas adicionales a los microorganismos.
- Control de calidad.
- Seguimiento de brotes.
- Otras, según necesidades.

8.7 INVESTIGACIÓN

Con las clínicas y los hospitales que lo soliciten se harán estudios de investigación relacionados con infecciones intrahospitalarias y resistencia bacteriana de microorganismos epidemiológicamente importantes.

8.7.1 Muestra analizada

Se realiza supervisión indirecta a los microorganismos epidemiológicamente importantes: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente; *Escherichia coli* Bles positivo; *Klebsiella pneumoniae* Bles positivo; *Klebsiella oxytoca* Bles positivo; *Enterococcus spp* vancomicina resistente; *Pseudomonas spp* multiresistente; *Acinetobacter baumannii* multiresistente; *Streptococcus pneumoniae*, y todo aquel microorganismo que presente resistencia inusual.

8.7.2 Conservación y transporte de muestras

- Las cajas y los tubos en los que se encuentran las cepas aisladas se deben conservar a temperatura ambiente o refrigeradas.

- No destapar ni las cajas ni los tubos.
- Transportarlos evitando su ruptura, y en caso dado informar para tomar medidas.

8.7.3 Criterios de selección

Las muestras se reciben de lunes a viernes de 7:30 de la mañana a 5 de la tarde. Deben venir acompañadas del formato respectivo del programa, que debe estar bien diligenciado.

8.7.4 Criterios de rechazo

Se rechazarán las cepas que no cumplan con las siguientes características: cajas o tubos partidos; cajas o tubos no marcados; cajas o tubos abiertos. Las muestras rechazadas se devuelven con la misma persona que las trajo de la institución.

8.7.5 Usuarios

Laboratorios de la red.

8.7.6 Tamaño de la muestra

Deben enviarse cepas aisladas a partir de pacientes con infección intrahospitalaria procesadas durante el mes en el área de microbiología, cepas de microorganismos con una resistencia inusual, y todas las cepas aisladas a partir de muestras tomadas de personal, pacientes o ambiente a partir de un brote.

8.7.7 Oportunidad de la entrega de resultados

Los resultados del programa de infecciones intrahospitalarias tienen una oportunidad de un mes; los de cepas provenientes de brotes intrahospitalarios de una semana.

8.8 PROCEDIMIENTO TÉCNICO EN EL LABORATORIO

8.8.1 El antibiograma

El objetivo del antibiograma es medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad ob-

servada *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento con antibiótico. El antibiograma permite entonces orientar las decisiones terapéuticas individuales.

Otro objetivo del antibiograma es seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a esto, los espectros clínicos de los antibióticos pueden revisarse regularmente, y adoptarse ciertas decisiones sanitarias, como el establecimiento de programas de prevención en los hospitales (17).

Existen numerosos métodos estandarizados por el CLSI para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana. Los más utilizados en el laboratorio son:

- *Método de dilución en placa o en caldo.* Es el *gold standard* de los test *in vitro*. En este procedimiento, un inóculo bacteriano determinado (usualmente 10⁵ unidades formadoras de colonias) se expone a diluciones seriadas del antibiótico por 18 a 24 horas. El resultado se expresa en concentración inhibitoria mínima (MIC), que es la menor concentración en microgramos por mililitro que inhibe el crecimiento de microorganismos.
- *Test de dilución en agar.* Sigue los mismos principios del anterior, excepto que las bacterias son inoculadas en platos. La MIC se define como la menor concentración a la cual no se observan colonias; sus desventajas son el costo y que no proporciona información cuantitativa.
- *Método de difusión en disco.* Se emplean discos de papel impregnados de antibiótico, colocados en la superficie de placas previamente inoculadas con el microorganismo aislado. Observando el tamaño del halo de inhibición de crecimiento se pueden obtener resultados semicuantitativos. La sensibilidad está determinada por el diámetro del halo, cuya lectura viene estandarizada.
- *E-test.* Se usa un cultivo en el que se coloca una tira de antibiótico con un gradiente de concentración. Permite estudiar la MIC mediante el análisis del halo de inhibición producido cuando los métodos tradicionales de medición de esta no son confiables. Por lo general se emplea para estudio de gérmenes difíciles como

Neisseria gonorrhoeae, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y anaerobios.

8.8.2 Categorías interpretativas del antibiograma

Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías (sensible, intermedio y resistente (S, I, R)), son el resultado de la integración de un conjunto de elementos: la distribución de las CIM para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes; las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos; la confrontación de los resultados *in vitro* y de los resultados clínicos, así como la variabilidad estadística de los métodos utilizados.

8.8.2.1 Sensible

La categoría *sensible* implica que una infección debido a una cepa puede ser tratada apropiadamente con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y microorganismo infectante.

8.8.2.2 Intermedio

La categoría *intermedio* incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con una CMI, que usualmente se aproximan al nivel de tejido y sangre disponible, y para los cuales la velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles.

8.8.2.3 Resistente

Cuando los esquemas de dosificación normales son usados, las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable del antibiótico.

8.8.3 Método de difusión en disco (*Kirby-Bauer*)

En 1966, después de los estudios realizados por Bauer Kirby, Sherris y Turk, ensayando diferentes cepas bacterianas, se estandarizó y correlacionó definitivamente el empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad con las CMI correspondientes.

En el método de difusión en disco el microorganismo por investigar se inocula en una o varias placas de agar, y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos con concentración conocida. El disco impregnado de antibiótico al ponerse en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde radialmente en el agar.

Se incuban las placas durante 16-24 horas a 35°C, y al cabo de este tiempo se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias oportunas publicadas por el CLSI. Con esta referencia podemos informar si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente (S, I, R) a cada uno de los antibióticos ensayados en las placas.

8.8.4 *Materiales y reactivos necesarios para determinar sensibilidad antibiotica*

8.8.4.1 Muestra

Agente bacteriano patógeno aislado de la(s) muestra(s) clínica(s). Con una incubación de 18-24 horas.

8.8.4.2 Medio de Agar Mueller-Hinton

De los muchos medios disponibles, se considera el Agar Mueller-Hinton como el mejor para pruebas de susceptibilidad de rutina de bacterias no fastidiosas por las siguientes razones:

- Reproducibilidad aceptable lote a lote para ensayo de susceptibilidad.
- Es bajo en inhibidores de sulfonamida, trimetoprim y tetraciclina.
- Crecimiento satisfactorio para la mayoría de los patógenos no fastidiosos.

➤ Preparación del Agar Mueller Hinton

1. El agar Mueller-Hinton debe ser preparado a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
2. Autoclavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45°C- 50°C.

3. Una vez esterilizado, verter el medio fresco y tibio en placas de petri (60 ml-70 ml ó 25 ml-30 ml, para placas de 150 mm ó 100 mm de diámetro interno respectivamente), de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.
4. Una vez solidificado, medir el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Esta medición puede realizarse:
 - Utilizando un electrodo de superficie.
 - Macerando el medio en agua destilada y utilizando un electrodo de inmersión.
 - Solidificando el agar con el electrodo del potenciómetro.
 - Realizar las pruebas de esterilidad para cada lote de Mueller Hinton, incubando una o dos placas de cada lote a 30°C-35°C durante 24 horas o más. Estas placas utilizadas deben ser, luego, descartadas.

8.8.4.3 Recomendaciones

El medio de agar se debe dejar enfriar a temperatura ambiente, y a menos que la placa no se use el mismo día debe guardarse en refrigerador (2-8°C). Las placas deben usarse en un lapso de 7 días después de la preparación tomando adecuadas precauciones, tal como envolver en plástico para minimizar el secado del agar, y que muestren correcto funcionamiento con los microorganismos de control de calidad.

➤ Requisitos del agar Mueller Hinton

1) pH

El agar debe tener un pH entre 7,2 y 7,4 después de gelificar a temperatura ambiente. Si el pH es muy bajo, ciertos medicamentos pierden potencia, por ejemplo, aminoglicósidos, quinolonas y macrólidos, mientras otros agentes pueden presentar excesiva actividad, por ejemplo, tetraciclinas. Si el pH es muy alto, puede esperarse efectos opuestos.

2) Humedad

La superficie del agar debe ser húmeda sin agua de condensación en la superficie del medio o en la tapa de la

placa antes de ser inoculada. Si hay un exceso de humedad justo antes del uso en la superficie del agar, las placas deben ponerse en una incubadora (35°C) o una cámara de flujo laminar con las placas entreabiertas hasta que el exceso de humedad se haya perdido por evaporación (usualmente de 10 a 30 minutos).

3) Efectos de timidina y timina

El medio que contiene excesiva cantidad de timidina o timina puede invertir los efectos inhibitorios de sulfonamidas y trimetoprim, dando zonas más pequeñas, menos nítidas o ninguna zona, lo que podría resultar en un falso informe de resistencia.

El agar Mueller-Hinton debe ser de tan bajo contenido en timidina como sea posible.

Para evaluar un nuevo lote de agar se utiliza la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 o *Enterococcus faecalis* ATCC 33186 con discos de trimetoprim/sulfametoxazole. Un medio satisfactorio dará esencialmente zonas nítidas de inhibición de más de 20 mm. En los medios con alto contenido de timidina se observarán zonas de inhibición con colonias dentro del halo, zonas menores de 20 mm o sin zona de inhibición.

4) Efectos de cationes divalentes

La variación en cationes divalentes, principalmente magnesio y calcio, afecta los resultados de ensayo de aminoglicósidos y tetraciclinas con cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Un contenido excesivo de cationes reduce el tamaño de las zonas de inhibición, mientras que el bajo contenido podría resultar en un tamaño mayor de lo esperado. Se prueba con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 con gentamicina y debe dar una lectura de 16-21 mm.

8.8.5 Preparación del estándar de turbidez (escala 0,5 Mac Farland)

1. Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como es-

tándar.

2. Agregar 0,5 ml de una solución de BaCl_2 0,048 M a 99,5 ml de una solución de H_2SO_4 0,18 M en constante movimiento para mantener la suspensión.
3. Verificar la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro o espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mac Farland.
4. Distribuir de 4 ml a 6 ml en tubos con tapa de rosca.
5. Ajustar bien las tapas, conservarlos en la oscuridad a temperatura ambiente y anotar la fecha de preparación.
6. Antes de ser usado, agitar vigorosamente dicho estándar, de preferencia, en un agitador mecánico.
7. Verificar mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, y reemplazarlo cuando sea necesario.

8.8.6 Preparación del inóculo

Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas:

1. De una placa de cultivo con agar no selectivo e incubada por 18 a 24 horas, seleccionar colonias aisladas y de la misma morfología, y preparar una suspensión directa en caldo Mueller Hinton o solución salina 0,85%.
2. La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0,5 de Mac Farland.

Recomendaciones. La turbidez del inóculo deberá ser verificada utilizando un espectrofotómetro a 625 nm con absorbancia de 0,08 a 0,10 o visualmente, comparando con la escala de Mac Farland contra una reglilla con líneas blancas y negras.

8.8.7 Inoculación de las placas

1. Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces, presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso

de inóculo.

2. Inocular la superficie de la placa de Mueller Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

8.8.8 Aplicación de los sensidiscos a las placas inoculadas

1. Colocar los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
2. Distribuir los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud debe ser de 6 mm). No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición.
3. Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

8.8.9 Incubación

1. Las placas de microorganismos no fastidiosos deben incubarse en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, a 35°C de 18 a 24 horas en aerobiosis.
2. Las placas de *Haemophilus spp* y *Streptococcus spp* deben ser incubadas en atmósfera del 5% de CO₂.
3. En los casos de *Staphylococcus spp* y *Enterococcus spp* el tiempo de incubación debe prolongarse por 24 horas para una mejor detección de la resistencia a Oxacilina y Vancomicina, respectivamente.

8.8.10 Lectura de las placas

Después del tiempo recomendado de incubación examinar cada placa y medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco así:

1. Medir los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador.
2. Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada, localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.
3. Tener la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo.
4. En los medios suplementados con sangre, las zonas son medidas en la parte superior de la superficie del agar y retirando la tapa.
5. Tener cuidado de no medir la zona de la hemólisis sino la de inhibición del crecimiento.
 - Para *Staphylococcus spp* o *Enterococcus spp*, usar luz transmitida manteniendo la placa arriba de la luz para examinar un posible ligero crecimiento de cepas resistentes a Oxacilina/Meticilina o Vancomicina dentro de los halos aparentes de inhibición. Cualquier desarrollo dentro de la zona de inhibición es indicativo de resistencia a Meticilina (Oxacilina) o Vancomicina.
 - El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona. Sin embargo, las colonias mayores creciendo dentro de la zona clara deberán ser subcultivadas, reidentificadas y reensayadas. Algunos *Proteus spp*, debido a su gran movilidad, pueden presentar un velo de invasión o *swarming* dentro de las zonas de inhibición de algunos antibióticos. En estos casos el velo del *swarming* debe ser ignorado al momento de medir los halos de inhibición.
 - Cuando se prueban discos de Cotrimoxazol pueden arrastrarse sustancias antagónicas que producen un crecimiento con aspecto de niebla dentro de la zona del halo de inhibición. En estos casos, no considerar en la lectura un crecimiento de 20% o menos del desarrollo total.

- La sensibilidad de la cepa bacteriana será reportada como sensible (S), intermedio (I), o resistente (R).

8.8.11 Conservación de los sensidiscos

Los discos deben ser almacenados como sigue:

1. Refrigerar los viales a 8°C o menos, o congelar a -14°C o más bajo, en nevera no formadora de escarcha.
2. Viales de discos sellados que contienen drogas de la clase β -lactámicos deben ser almacenados congelados, excepto pequeñas cantidades para trabajo inmediato, las que pueden ser refrigeradas sólo para una semana. Algunos agentes como, por ejemplo, combinaciones de imipenem, cefaclor, combinaciones de antibióticos β -lactámicos con inhibidores de β lactamasas pueden conservar mayor estabilidad si se almacenan congelados hasta el día de uso.
3. Los viales de discos que no han sido abiertos deben ser sacados del refrigerador o congelador, 1 ó 2 horas antes de usar para que iguallen su temperatura a la del ambiente antes de abrir. Este procedimiento minimiza la cantidad de condensado que se forma cuando aire caliente toca los discos fríos.
4. Una vez que un vial de discos se ha sacado de su paquete sellado, debe ser puesto en un desecador bien sellado. Cuando se usa un dispensador de discos, este debe ser puesto con una cubierta ajustada y con un agente desecante adecuado.
5. Dentro del plazo sólo se pueden usar los discos con fecha de expiración del fabricante.

8.9 DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS

8.9.1 Detección de la resistencia a meticilina por *Staphylococcus aureus*

El método considerado *gold standard* para identificar las cepas de *Staphylococcus* resistentes a meticilina (oxacilina) es la detección del gen *mecA*. El gen *mecA* codifica la formación de una PBP denominada PBP2 a la que tiene una baja afinidad por meticilina y oxacilina y, por tanto, estas cepas son resistentes al tratamiento con estos agentes antimicrobianos.

8.9.1.1 Prueba con oxacilina por difusión en agar

- Medio de cultivo: agar Mueller Hinton
- Inóculo: suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton o solución salina al 0,85% a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- Disco de sensibilidad antibiótica: Oxacilina de 1 ug.
- Incubación: incubar a 35°C por 24 horas completas.
- Lectura e interpretación: examinar halos de inhibición buscando colonias aisladas dentro del halo e interpretar según los estándar del CLSI:

Microorganismo	Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Staphylococcus aureus</i>	≥13 mm	11-12 mm	≤10 mm
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	≥18 mm	-	≤17 mm

- Control de calidad: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: sensible.

8.9.1.2 Prueba tamiz con oxacilina por dilución en agar

Se hace cuando el resultado de la lectura de la prueba de detección de resistencia a oxacilina por el método de difusión en disco oscila entre rangos de intermedio a resistente.

- Medio de cultivo: agar Mueller Hinton suplementado con NaCl al 4% con una concentración de oxacilina de 6 µg/ml.
- Inóculo: suspensión directa de la colonia en caldo Mueller Hinton o solución salina al 0,85 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- Inoculación en la placa: sumergir un hisopo estéril en la suspensión, rotar el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo o se puede usar un asa de 10 µl. Se debe sembrar en un área de 10-15 mm de diámetro o un cuadrante de la placa. La placa se puede dividir de 4 a 8 porciones.

- Incubación: incubar a 35°C por 24 horas completas. Si una cepa demuestra resistencia a las 18 horas (una o más colonias creciendo en el agar) se puede informar como resistente, pero si no se observa crecimiento se debe incubar hasta completar las 24 horas antes de informar.
- Lectura e interpretación: examine la superficie del agar y observe la presencia o ausencia de crecimiento.
- Control de calidad: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: sensible; *Staphylococcus aureus* ATCC 43300: resistente.

8.9.1.3 Prueba tamiz con cefoxitin

Esta prueba se utiliza para predecir la existencia del gen *mecA*, mediador de resistencia antimicrobiana en el *Staphylococcus aureus*.

- Medio de cultivo: agar Mueller-Hinton.
- Inóculo: suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- Disco de sensibilidad antibiótica: Cefoxitina 30 µg.
- Incubación: incubar a 35°C por 24 horas.
- Lectura e interpretación:

Staphylococcus aureus y *S. lugdunensis*

Diámetro de la zona (mm)	Interpretación
≤21	Oxacilina resistente
≥22	Oxacilina sensible

Staphylococcus coagulasa negativa

Diámetro de la zona (mm)	Interpretación
≤24	Oxacilina resistente
≥ 25	Oxacilina sensible

- Prueba confirmatoria: método de microdilución en caldo
 - 1) *Medio de cultivo*: caldo Mueller-Hinton suplementado con NaCl al 4%, con diferentes concentraciones del antibiótico oxacilina obtenidas a partir de diluciones.

- 2) *Inóculo*: suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85% a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- 3) *Incubación*: incubar a 35°C por 24 horas.
- 4) *Lectura e interpretación*: luego del periodo de incubación se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteriano. Un tubo de caldo de Mueller-Hinton se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Microorganismo	S	I	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤2 µg/ml	-	≥4 µg/ml
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	≤0,25 µg/ml	-	≥0,5 µg/ml

- 5) *Control de calidad*: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: sensible.

8.9.1.4 Detección de susceptibilidad disminuida a vancomicina

En la actualidad, el CLSI recomienda el método de la placa de *screening* para detectar las cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina. El método de difusión por disco no es confiable en la detección de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina, ya que no diferencia estas cepas de cepas susceptibles. Por este motivo, el CLSI no recomienda usar este método. En cambio preconiza la placa de *screening* preparada con agar de infusión cerebro corazón (BHI).

- Prueba tamiz en agar BHI

La placa de *screening* (BHI con 6 µg/ml de vancomicina) incubada por 24 horas puede ser usada como método de *screening*. Este método necesita confirmación por un método de CIM en cepas que aparecen como resistentes. Además, debe haber estricto control

de calidad con cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

- 1) *Medio de cultivo*: agar BHI con 6 µg/ml de vancomicina.
- 2) *Inóculo*: suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- 3) *Incubación*: incubar a 35°C por 24 horas.
- 4) *Lectura e interpretación*: si se observa el crecimiento <1 colonia se presume resistencia. Si no se observa crecimiento es sensible.
- 5) *Control de calidad*: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213: sensible a vancomicina.

- Prueba confirmatoria: método microdilución en caldo

Si una cepa de estafilococo crece en la placa de *screening*, esta cepa debe ser confirmada como resistente usando el método de dilución en caldo para obtener la CMI.

- 1) *Medio de cultivo*: caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes, con diferentes concentraciones del antibiótico vancomicina obtenidas a partir de diluciones.
- 2) *Inóculo*: suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- 3) *Incubación*: incubar a 35°C por 24 horas.
- 4) *Lectura e interpretación*: luego del periodo de incubación se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteriano. Un tubo de caldo de Mueller-Hinton se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), se designa como la concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir, la concentración siguiente la cual ya no se observa desarrollo de la bacteria.

Interpretación	CMI µg/ml
Intermedio	4-8 µg/ml
Sensible	0,5-2 µg/ml

- 5) *Control de calidad: Staphylococcus aureus* ATCC 29213: sensible a vancomicina

8.9.1.5 Detección a la resistencia a macrólidos

La resistencia de aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa puede ser por dos mecanismos de resistencia:

1. Resistencia constitutiva o inducida a clindamicina: metilación de la 23S de rRNA codificado por el gen *erm* llamado MLSB de resistencia (macrólidos, lincosamida y estreptogramina B).
2. Resistencia a macrólidos: mecanismo de eflujo codificado por el gen *msrA*.

Cuando un aislamiento de *Staphylococcus aureus* es resistente a eritromicina y sensible a clindamicina, no se debe reportar clindamicina sensible sin haber realizado el “test D”.

8.9.1.6 Test

- 1) *Medio de cultivo*: agar Mueller-Hinton.
- 2) *Inóculo*: suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- 3) *Disco de sensibilidad antibiótica*: eritromicina de 15 µg; clindamicina de 2 µg.
- 4) *Aplicación de los sensidiscos a las placas inoculadas*: colocar sobre la placa inoculada un disco de eritromicina de 15 µg con un disco de clindamicina de 2 µg a una distancia de 15 a 26 mm entre ellos.
- 5) *Incubación*: incubar a 35°C por 24 horas.
- 6) *Lectura e interpretación*:

Eritromicina	Clindamicina	Informe
Sensible	Sensible	Sensible a ambas drogas
Resistente	Resistente	Resistente a ambas drogas
Resistente	Prueba D negativa	Resistente a eritromicina y Sensible a clindamicina
Resistente	Prueba D positiva	Resistente a ambas drogas

Reacción positiva: resistencia inducible a clindamicina (mediada-erm).

Reacción negativa: no hay inducción (resistencia a eritromicina mediada por el gen *msrA*).

8.9.1.7 Antibiograma para *Enterococcus* vancomicina resistentes

La resistencia a glicopéptidos puede tener varios fenotipos:

- Fenotipo VanA: que normalmente tienen codificados los genes para van A pero presenta modificaciones de otros genes. Tiene resistencia tanto a vancomicina como a teicoplanina.
- Fenotipo VanB: hay varios genes descritos, con susceptibilidad a teicoplanina y resistencia a vancomicina.
- Fenotipos VanC: intrínseco de algunas especies como *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus*, también con resistencia a vancomicina pero buena susceptibilidad a teicoplanina. Estas especies pueden colonizar el tracto gastrointestinal pero no tienen importancia clínica. En caso encontrarse *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium* el paciente debiera ser aislado por un elevado riesgo de diseminación.
- Fenotipo VanD: resistencia constitutiva moderada a vancomicina y bajo nivel a teicoplanina.
- Fenotipo VanE: sensible a teicoplanina, moderada resistencia a vancomicina.

- Fenotipo VanG: moderadamente resistente a vancomicina y sensible a teicoplanina.

La resistencia se debe a la alteración del sitio de acción; para actuar con éxito, los glicopéptidos se ligan a la porción terminal del peptido- glicano de la pared bacteriana del Gram positivo, las cepas resistentes alteran los últimos aminoácidos de esta molécula evitando que los glicopéptidos se unan y ejerzan su efecto antibacteriano.

Genotipo	Vancomicina CMI ug/ml	Teicoplanina CMI ug/ml	Base genética	Especies
Van A	64->1024	16-512	Plasmidio- cromosomal Transferible	<i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i>
Van B	4-1024	<0,5	Plasmidio- cromosomal Transferible	<i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Ente- rococcus faecium</i>
Van C	2-32	<0,5	Cromosomal No transferible	<i>Enterococcus gallinarum</i> y <i>Enterococcus casseliflavus</i>
Van D	64-256	4	Cromosomal No transferible	<i>Enterococcus faecium</i>
Van E	16	0,5	Cromosomal No transferible	<i>Enterococcus faecalis</i>

- Prueba tamiz por difusión en disco
 - 1) *Medio de cultivo*: Mueller-Hinton con 5% de sangre de cor-dero.
 - 2) *Inóculo*: suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85% a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
 - 3) *Disco de sensibilidad antibiotica*: vancomicina de 30 µg.
 - 4) *Incubación*: incubar a 35°C por 24 horas con 5% de CO₂.
 - 5) *Lectura e interpretación*:

Interpretación	Díámetro del halo (mm)
Resistente	≤14
Intermedio	15-16
Sensible	≥17

- Prueba tamiz en agar BHI
 - 1) Agar infusión cerebro corazón (BHI) con 6 µg/ml de vancomicina.
 - 2) Inóculo. Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0.85 % a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18 – 24 h de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
 - 3) Incubación. Incubar a 35°C por 24 horas.
 - 4) Lectura e interpretación:
 - si se observa el crecimiento <1 colonia se presume resistencia.
 - Si no se observa crecimiento es sensible.
 - 5) Control de calidad:
 - Enterococcus faecalis* ATCC 29212: sensible.
 - Enterococcus faecalis* ATCC 51290: resistente.

8.9.1.8 Prueba confirmatoria: método microdilución en caldo medio de cultivo

Caldo Mueller-Hinton ajustado con cationes, con diferentes concentraciones del antibiótico vancomicina obtenidas a partir de diluciones. Al preparar la vancomicina la solución madre del antibiótico debe estar en concentraciones de 10.000 µg/ml o en concentraciones mayores en un volumen no menor de 10 ml.

- 1) *Inóculo*. Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85% a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- 2) *Incubación*. Incubar a 35°C por 24 horas.
- 3) *Lectura e interpretación*. Luego del periodo de incubación se observa la turbidez de los tubos que indicará desarrollo bacteria-

no. Un tubo de caldo de Mueller-Hinton se mantiene sin inocular como control negativo de crecimiento. La concentración de antibiótico que presente ausencia de crecimiento, detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo) se designa como la concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir, la concentración siguiente la cual ya no se observa desarrollo de la bacteria.

Interpretación	CMI µg/ml
Resistente	≥32
Sensible	≤4

4) *Control de calidad. Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

8.10 DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

8.10.1 Detección de BLEE (betalactamasas de espectro extendido)

β-lactamasas de espectro expandido (BLEE) son enzimas cuyo origen proviene de mutaciones en genes que codifican β-lactamasas plasmídicas tales como TEM-1, TEM-2, y SHV-1. BLEE puede conferir resistencia a cefotaxime, ceftazidine, aztreonam, penicilinas de espectro expandido y β-lactámicos estructuralmente relacionadas a cepas aisladas en clínica de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, y unos pocos otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que usualmente son susceptibles para β-lactámicos de espectro extendido.

8.10.2 Prueba tamiz método de difusión en disco

Prueba estandarizada para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*.

- 1) *Medio de cultivo.* Agar Mueller-Hinton.
- 2) *Inóculo.* Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85% a partir de un cultivo en agar no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.
- 3) *Disco de sensibilidad antibiótica:*

Ceftazidima de 30 µg.

Cefotaxima de 30 µg.

Ceftriaxona de 30 µg.

Aztreonam de 30 µg.

4) *Incubación*. Incubar a 35°C por 18 horas a 24 horas.

5) *Lectura e interpretación*:

Antibiótico	Diámetro del halo de inhibición (mm)
Ceftazidima	≤22 mm
Cefotaxima	≤27 mm
Ceftriaxona	≤25 mm
Aztreonam	≤27 mm

Basado en los resultados obtenidos y de acuerdo con los parámetros de interpretación del CLSI, el aislamiento que presente resistencia franca a uno o todos los antibióticos anteriormente utilizados, será sospechoso de BLEE.

6) *Control de calidad*

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603: cepa productora de BLEE.

Ceftazidima con un diámetro de 9-16 mm.

Cefotaxima con un diámetro de 10-18 mm.

Ceftriaxona con un diámetro de 16-24 mm.

Aztreonam con un diámetro de 9-17 mm.

8.10.3 Prueba confirmatoria: método de difusión en disco

Esta prueba emplea inhibidores de las betalactamasas como el ácido clavulánico en combinación con cefalosporinas de tercera generación. El ácido clavulánico inhibe la presencia de las BLEE ocasionando disminución del nivel de resistencia a las cefalosporinas.

1) *Medio de cultivo*. Agar Mueller-Hinton.

2) *Inóculo*. Suspensión directa de la colonia en caldo Mueller-Hinton o solución salina al 0,85% a partir de un cultivo en agar

no selectivo de 18-24 horas de incubación. Ajustar a la turbidez equivalente al estándar 0,5 de la escala de Mac Farland.

3) *Disco de sensibilidad antibiótica*

Ceftazidima de 30 μg

Cefotaxima de 30 μg

Ceftazidima/Ácido clavulánico (30/10 μg)

Cefotaxima/Ácido clavulánico (30/10 μg)

4) *Aplicación de los sensibilizadores a las placas inoculadas.* Colocar sobre la placa inoculada un disco de Ceftazidima de 30 μg , y a unos 30 mm se coloca un disco de Ceftazidima/Ácido clavulánico (30/10 μg), y de igual forma se coloca Cefotaxima de 30 μg y Cefotaxima/Ácido clavulánico (30/10 μg).

5) *Incubación.* Incubar a 35°C por 18 horas a 24 horas.

6) *Lectura e interpretación.* Si en los resultados obtenidos, los discos de Ceftazidima/Ácido Clavulánico y Cefotaxima/Ácido Clavulánico presentan zonas de inhibición superiores 5 mm a aquellos producidos por los discos de Ceftazidima y Cefotaxima, respectivamente, se considera el test como positivo confirmándose una verdadera BLEE.

7) *Reporte según el CLSI.* Una vez detectadas las cepas productoras de estas “betalactamasas de espectro extendido” deben ser reportadas como resistentes a todas las penicilinas, las cefalosporinas (excepto cefamicinas) y al Aztreonam.

Las B-lactamasas Amp C son enzimas capaces de hidrolizar todos los antibióticos B-lactámicos de alguna forma. Han sido detectados genes cromosómicos inducibles en plasmidos que los transfirieron a microorganismos que usualmente no expresan este tipo de B-lactamasas. Las Amp C codificadas por plasmidos se convierten en un problema debido a la dificultad de detección de tipo fenotípico y llegan a confundirse con B-lactamasas de espectro extendido.

Se debe tener presente que los microorganismos que expresan estas enzimas no son resistentes a las cefalosporinas de tercera generación a menos que las Amp C B-lactamasas se detecten en altos niveles.

Es necesario distinguir entre los microorganismos productores de Amp C resistentes a cefoxitina de los que no lo son, esto debido a las repercusiones terapéuticas. Debido a que los gérmenes productores de Amp C resistentes a cefoxitin requerirán el empleo de carbapenémicos, mientras que los no resistentes y no productores de BLEE podrán tratarse con cefalosporinas de amplio espectro (21).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Visión actualizada de las infecciones intrahospitalarias. *Rev Cubana Med Milit* 2002; 31(3): 201-8.
2. Entralgo PL. Historia universal de la medicina. Barcelona Salvat, tomo III, p 318-320.
3. Carol Buck, Álvaro Llopis, Enrique Nájera, Milton Terris. El desafío de la epidemiología, 1994, OPS, publicación científica 505.
4. Nosocomial infection surveillance, 1984, *MMWR CDC Surveill Summ* 1986; 35 (No. 1ss): 17ss.
5. Samuel Ponce de León, José Luis Soto H., 1996, Infecciones intrahospitalarias, volumen 1, Mc Graw Hill.
6. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Protocolos de vigilancia en salud pública.
7. World Health Organization, 51st World Health Assembly. Emerging and other communicable diseases, antimicrobial resistance (Res. WHA 51.17/ 1998).
8. Howard D, Cordell R, McGowan JE et al. Measuring the economic costs of antimicrobial resistance in hospital settings: Summary of the Centers for Disease Control and Prevention–Emory Workshop. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1573–8.
9. Pérez A, Dennis RJ., Rodríguez B, Castro AY, Delgado V, Lozano JM, Castro MC. An interrupted time series analysis of parenteral antibiotic use in Colombia. *J Clin Epidemiol.* 2003; 56(10): 1013-1020.
10. Arias CA, Reyes J, Zúñiga M, Cortés L, Cruz C, Rico L, Pa-

- neso D. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in *Enterococci* and *Staphylococci* from Colombian hospitals, 2001-2002. *Journal Antimicrobial Chemother* 2003;51:59-68.
11. Cortés JA, Álvarez CA, Leal AI, Grebo. Antimicrobial resistance Grebo. Programa de vigilancia de resistencia bacteriana en el Distrito Capital. Universidad Nacional de Colombia. 2005.
 12. World Health Organization's strategy to contain resistance to antimicrobial drugs. *Rev Panam Salud Pública* 2001; 10(4): 284-94.
 13. Vigilancia por el Laboratorio de patologías bacterianas de importancia en salud pública. INS 2002.
 14. Manual de bioseguridad en el laboratorio de microbiología y biomédica. CDC. Cuarta edición. 2003.
 15. Manual de bioseguridad en el laboratorio. Segunda edición. Ginebra, OMS, 1994.
 16. Elmer Koneman, 1999, Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Editorial Panamérica.
 17. CLSI, 2007, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. January.
 18. Instituto Nacional de Salud. Vigilancia por el laboratorio de patologías bacterianas de importancia en salud pública. 2002.
 19. CIB Corporación para investigaciones biológicas. Fundamentos de medicina. Sexta edición. Medellín. 2003.
 20. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá, 2004, Política de prevención, vigilancia epidemiológica y control de infecciones intrahospitalarias para Bogotá, D. C.
 21. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52 (1): 2-4, 2003.

