

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y**  
**BIOTECNOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL DURANTE EL PROCESO  
DE MANIPULACIÓN DE ANTINEOPLÁSICOS EN LA UNIDAD DE MEZCLAS  
ONCOLÓGICAS DEL INSTITUTO REGIONAL DE ENFERMEDADES  
NEOPLÁSICAS DEL SUR. AREQUIPA – 2015”**

TESIS PRESENTADA POR LA  
BACHILLER:

**GIL CALSIN, FIORELLA  
YAJHAIRA.**

PARA OPTAR EL TÍTULO  
PROFESIONAL DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

ASESOR:

**JOSÉ ANTONIO VILLANUEVA  
SALAS, PhD.**

AREQUIPA - PERÚ

2015



Dedico mi tesis a todos los seres que amo.

Y a las personas que dejaron de buscar el  
cambio en el mundo y se decidieron a ser el  
cambio que quieren ver en el mundo.

Mahatma Gandhi

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser el combustible que impulsa mi vida.

A mis padres, por ser mis primeros súper héroes, por mostrarme el mundo a su manera y por ser mis más grandes admiradores.

A mi hermana, mi primera cómplice y mi mejor amiga, por actuar con la misma rigurosidad al premiar mis aciertos y corregir mis equivocaciones.

Al resto de mi familia, por su amor y su laborioso pero incansable apoyo.

A mis maestros de inicial, primaria, secundaria y universidad, por lograr que aprendiera todo lo que sé, estoy segura que muchas veces creyeron que sería difícil alimentar el conocimiento de alguien como yo.

A mis asesores y amigos, José Villanueva Salas y Jorge Luis Santos Delgado, por su paciencia y por guiarme sabiamente durante el transcurso de esta investigación.

A todas las personas que laboran en el servicio de farmacia del IREN-Sur por brindarme su amistad y un gran ejemplo de vocación de servicio, un agradecimiento especial a los químicos farmacéuticos Lourdes Cornejo Núñez y Guillermo Zegarra Aguilar por su orientación y participación en este trabajo de investigación.

Y por último pero no menos importante, a mis amigos a quienes cariñosamente llamo "la macha", que compartieron conmigo más de una complicada experiencia, por impulsarme y animarme a seguir adelante y sobre todo por ser aquellos hermanos escogidos que ahora forman parte incondicional de mi vida.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>20</b>
1. Higiene de la unidad de mezclas oncológicas.....	20
1.1. Sistemática de limpieza.....	20
1.1.1. Limpieza rutinaria.....	20
1.1.2. Descontaminación.....	21
1.2.Límites recomendados para la contaminación microbiana.....	21
2. Contaminación microbiana.....	22
2.1.Factores que condicionan las enfermedades infecciosas.....	22
2.2.Flora microbiana normal.....	23
2.3.Bacterias.....	23
2.3.1. Forma y agrupación de células bacterianas.....	24
2.3.2. Enterobacterias.....	25
2.3.3. <i>Staphylococcus</i> y microorganismos relacionados.....	28
2.4.Hongos.....	29
2.4.1. Importancia de los hongos.....	29
2.4.2. Taxonomía, estructura y replicación.....	30
2.4.3. <i>Aspergillus</i> .....	31
2.4.4. <i>Penicillium</i> .....	35

2.4.5. <i>Rhizopus</i> .....	35
2.4.6. <i>Absidia</i> .....	36
2.4.7. <i>Fusarium</i> .....	37
2.4.8. Dematiáceos.....	38
3. Medios de cultivo.....	41
3.1.Condiciones generales para el cultivo de microorganismos.....	42
3.1.1. Disponibilidad de nutrientes adecuados.....	42
3.1.2. Consistencia adecuada del medio.....	43
3.1.3. Presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases.....	44
3.1.4. Condiciones adecuadas de humedad.....	44
3.1.5. Luz ambiental.....	44
3.1.6. pH.....	44
3.1.7. Temperatura.....	45
3.1.8. Esterilidad del medio.....	46
3.2.Tipos básicos de medios de cultivo.....	46
3.2.1. Atendiendo a su estado físico.....	46
3.2.2. Según su utilización.....	47
3.2.3. Atendiendo a su composición.....	49
3.3.Medios de cultivo comunes.....	49
3.3.1. Agar Trypticasa de soya.....	49
3.3.2. Agar Mac Conkey.....	50
3.3.3. Agar SS.....	50
3.3.4. Agar Manitol Salado.....	50
3.3.5. Agar Sabouraud.....	50
<b>CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
1. Lugar de investigación.....	51
2. Materiales.....	51
2.1.Material microbiológico.....	51

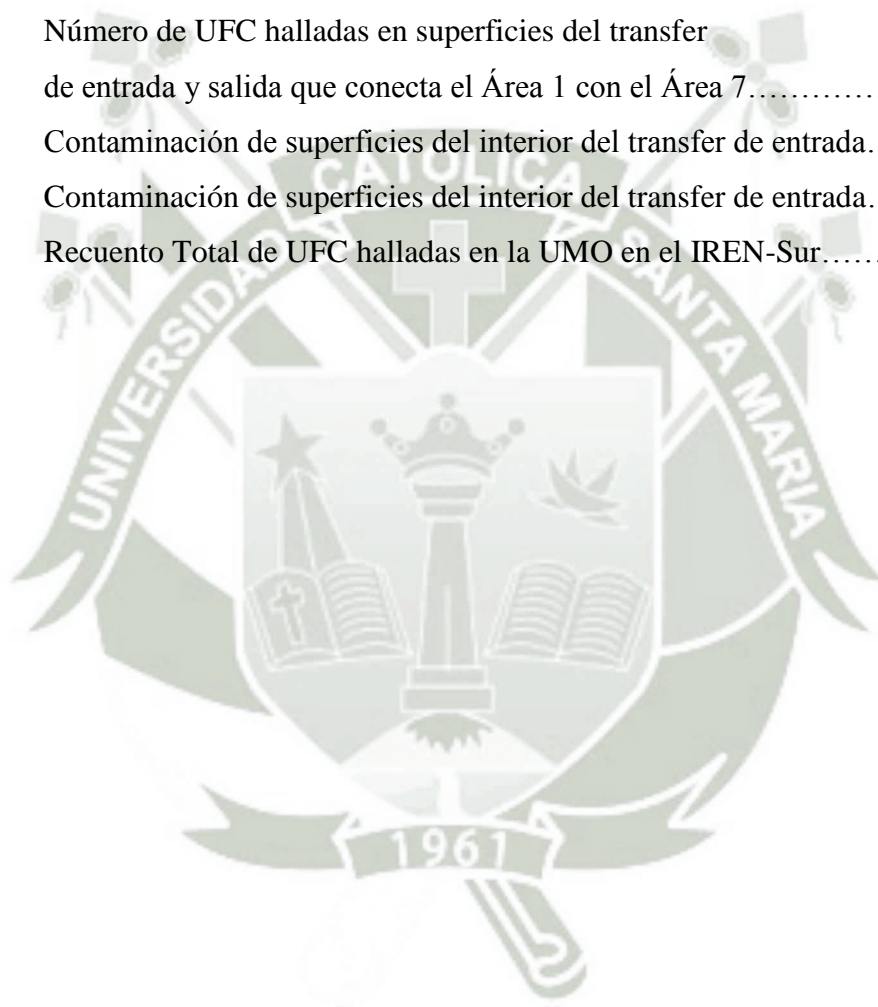
2.2. Material de laboratorio.....	51
2.2.1. Medios de cultivo.....	51
2.2.2. Material de vidrio y otros.....	52
2.2.3. Reactivos de identificación.....	52
2.2.4. Equipos.....	52
3. Métodos.....	53
3.1. Preparación de los medios de cultivo.....	53
3.2. Fundamento de los medios de cultivo.....	53
3.2.1. Agar Trypticase de soya.....	53
3.2.2. Agar Mac Conkey.....	54
3.2.3. Agar SS.....	55
3.2.4. Agar manitol Salado.....	56
3.2.5. Agar Sabouraud.....	57
3.3. Métodos de recolección de muestra.....	58
3.3.1. Evaluación microbiológica del aire.....	58
3.3.2. Evaluación microbiológica de superficies, manos de manipulador y agua.....	58
3.4. Procedimiento de recolección de muestra.....	59
3.5. Conteo e identificación de muestras.....	59
3.5.1. Conteo de UFC.....	59
3.5.2. Identificación de bacterias.....	60
3.5.3. Identificación de Mohos.....	62
<b>CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
1. Microorganismos aerobios mesófilos viables.....	64
2. Análisis e identificación de <i>Staphylococcus</i> .....	65
3. Análisis e identificación de hongos.....	68
4. Cuantificación de UFC por áreas.....	76

4.1.Área 1 o de acondicionamiento.....	76
4.1.1. Número de UFC halladas por el método de sedimentación.....	77
4.1.2. Número de UFC halladas por el método de contacto.....	80
4.2.Área 2 o de preparación.....	84
4.2.1. Número de UFC halladas por el método de sedimentación.....	84
4.2.2. Número de UFC halladas por el método de contacto.....	86
4.3.Área 3 o área de paso.....	89
4.4.Área 4 o cuarto de baño.....	91
4.5.Área 5 o área de vestuario.....	92
4.6.Área 6 o área de almacenamiento.....	93
4.7.Área 7 o sala de quimioterapia.....	95
4.7.1. Número de UFC halladas por el método de sedimentación.....	95
4.7.2. Número de UFC halladas por el método de contacto.....	97
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>100</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1-1	Límites recomendados para contaminación microbiana.....	21
Tabla 1-2	Resumen de miembros de la flora normal y sus localizaciones anatómicas.....	23
Tabla 1-3	Miembros medicamente importantes de la flora normal.....	26
Tabla 1-4	Características morfológicas más importantes de las especies de <i>Aspergillus</i> .....	33
Tabla 1-5	Características de <i>Alternaria</i> y <i>Cladosporium</i> .....	38
Tabla 3-1	Diferencias entre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	67
Tabla 3-2	Número de UFC de bacterias halladas por sedimentación en el Área 1.....	75
Tabla 3-3	Número de UFC de levaduras y hongos hallados por sedimentación en el Área 1.....	76
Tabla 3-4	Número de UFC que representan la contaminación del Aire en el AREA 1.....	76
Tabla 3-5	Número de UFC halladas por contacto en superficies del Área 1.....	78
Tabla 3-6	UFC cuantificadas por contacto en otras superficies, agua, manos y jabón del Área 1.....	79
Tabla 3-7	Contaminación de superficies ÁREA 1.....	80
Tabla 3-8	Número de UFC de bacterias y hongos hallados por sedimentación en el Área 2.....	81
Tabla 3-9	Número de UFC que representan la contaminación del Aire en el AREA 2.....	82
Tabla 3-10	Número de UFC halladas por contacto en superficies del Área 2.....	84
Tabla 3-11	Contaminación de superficies ÁREA 2.....	85
Tabla 3-12	Número de UFC halladas en el Área 3.....	86
Tabla 3-13	Contaminación del aire en el AREA 3.....	86
Tabla 3-14	Número de UFC halladas en el Área 4.....	87

Tabla 3-15	Contaminación del aire del Área 4.....	88
Tabla 3-16	Número de UFC halladas en el Área 5.....	89
Tabla 3-17	Contaminación del aire del Área 5.....	89
Tabla 3-18	Número de UFC halladas en el Área 6.....	90
Tabla 3-19	Contaminación en el aire ÁREA 6.....	90
Tabla 3-20	Número de UFC halladas en el Área 7.....	92
Tabla 3-21	Contaminación en el Aire ÁREA 7.....	92
Tabla 3-22	Número de UFC halladas en superficies del transfer de entrada y salida que conecta el Área 1 con el Área 7.....	94
Tabla 3-23	Contaminación de superficies del interior del transfer de entrada.....	95
Tabla 3-24	Contaminación de superficies del interior del transfer de entrada.....	96
Tabla 3-25	Recuento Total de UFC halladas en la UMO en el IREN-Sur.....	97



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1	Factores que condicionan las enfermedades infecciosas.....	23
Figura 1-2	Forma y agrupaciones de células bacterianas.....	25
Figura 1-3	Características microbiológicas de <i>Aspergillus</i> .....	31
Figura 1-4	Características microbiológicas de <i>Penicillium</i> .....	34
Figura 1-5	Características microbiológicas de <i>Rhizopus</i> .....	35
Figura 1-6	Características microbiológicas de <i>Absidia</i> .....	36
Figura 1-7	Características microbiológicas de <i>Fusarium</i> .....	37
Figura 1-8	Características microbiológicas de <i>Alternaria</i> .....	40
Figura 1-9	Características microbiológicas de <i>Cladosporium</i> .....	40
Figura 1-10	Rangos de temperatura para el crecimiento bacteriano.....	44
Figura 2-1	Designación de las áreas de la Unidad de Mezclas Oncológicas.....	59
Figura 3-1	Plano de la UMO.....	62
Figura 3-2	UFC contabilizadas en medio TSA.....	63
Figura 3-3	Crecimiento Bacteriano en Agar Manitol Salado.....	63
Figura 3-4	Racimos de cocos Gram positivos.....	65
Figura 3-5	Prueba Catalasa positiva.....	65
Figura 3-6	Prueba Coagulasa positiva.....	66
Figura 3-7	Prueba Coagulasa negativa.....	00
Figura 3-8	Micelio y reverso de colonia de <i>Penicillium</i> .....	67
Figura 3-9	Observación microscópica de <i>Penicillium</i> .....	68
Figura 3-10	Micelio y reverso de colonia de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	68
Figura 3-11	Observación microscópica de <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	68
Figura 3-12	Micelio y reverso de colonia de <i>Aspergillus niger</i> .....	69
Figura 3-13	Observación microscópica de <i>Aspergillus niger</i> .....	69
Figura 3-14	Micelio y reverso de colonia de <i>Aspergillus flavus</i> .....	69
Figura 3-15	Observación microscópica de <i>Aspergillus flavus</i> .....	70
Figura 3-16	Micelio y reverso de colonia de <i>Cladosporium</i> .....	70
Figura 3-17	Observación microscópica de <i>Cladosporium</i> .....	70

Figura 3-18	Micelio y reverso de colonia de <i>Fusarium</i> .....	71
Figura 3-19	Observación microscópica de <i>Fusarium</i> .....	71
Figura 3-20	Micelio y reverso de colonia de <i>Rhizopus</i> .....	71
Figura 3-21	Observación microscópica de <i>Rhizopus</i> .....	72
Figura 3-22	Micelio y reverso de colonia de <i>Absidia</i> .....	72
Figura 3-23	Observación microscópica de <i>Absidia</i> .....	72
Figura 3-24	Micelio y reverso de colonia de <i>Alternaria</i> .....	73
Figura 3-25	Observación microscópica de <i>Alternaria</i> .....	73
Figura 3-26	Diferenciación de la contaminación por zonas del Área 1.....	77
Figura 3-27	Crecimiento bacterial de la muestra de agua.....	79
Figura 3-28	Contaminación de superficies en el Área 1.....	80
Figura 3-29	Diferenciación de la contaminación por zonas del Área 2.....	82
Figura 3-30	Contaminación de superficies Área 2.....	86
Figura 3-31	Contaminación del Área 3.....	87
Figura 3-32	Contaminación del Área 4.....	88
Figura 3-33	Contaminación del Área 5.....	90
Figura 3-34	Contaminación del Área 6.....	91
Figura 3-35	Contaminación del Transfer de entrada del Área 7.....	93
Figura 3-36	Contaminación de la zona de quimioterapia del Área 7.....	93
Figura 3-37	Contaminación de superficies del interior del transfer de entrada.....	95
Figura 3-38	Contaminación de superficies del interior del transfer de salida.....	96
Figura 3-39	Recuento Total de UFC halladas en la UMO en el IREN-Sur.....	97

### TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	TÉRMINOS
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>IREN-Sur</b>	Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur
<b>UMO</b>	Unidad de Mezclas Oncológicas
<b>BPM</b>	Buenas Prácticas de Manufactura
<b>CSB</b>	Cabina de Seguridad Biológica
<b>PIC</b>	Convención de Inspección Farmacéutica
<b>TSA</b>	Agar Trypticosa de soya
<b>MC</b>	Agar Mac Conkey
<b>SS</b>	Agar <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>
<b>MS</b>	Agar Manitol Salado
<b>SAB</b>	Agar Sabouraud

## RESUMEN

De acuerdo a protocolos farmacéuticos, existen productos que deben cumplir con una serie de especificaciones mediante la aplicación de las normas de buenas prácticas de manufactura (BPM) que aunque hasta hace pocos años sólo se circunscribían al ámbito industrial, en la actualidad constituyen una exigencia adicional hospitalaria.

La calidad microbiológica del ambiente donde se prepara quimioterapia antineoplásica es un factor esencial para que sea realizada de forma óptima y adecuada. Por consiguiente la seguridad del paciente oncológico termina dependiendo mucho de la esterilidad del producto, ya que son pacientes generalmente inmunodeprimidos.

El objetivo de este estudio es evaluar microbiológicamente el proceso de preparación de antineoplásicos en la Unidad de Mezclas Oncológicas del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur.

El material se recolectó del aire, superficies, agua y manos de manipuladores en siete áreas diferenciadas: Área de acondicionamiento, área de preparación, zona de paso, cuarto de baño, área de vestuario, área de almacenamiento y parte de la sala donde los pacientes reciben la quimioterapia.

Los especímenes de bacterias y hongos fueron identificados por su crecimiento en medios selectivos, su morfología macroscópica, morfología microscópica y procedimientos enzimáticos.

La mayoría de UFC contabilizadas corresponde a microorganismos aerobios mesófilos viables comunes, que fueron hallados en proporción a la calidad de cada área. Sin embargo también se encontraron bacterias del género *Staphylococcus* y hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Absidia*.

Los resultados señalados demuestran una contaminación microbiológica en los procesos de preparación de la terapia antineoplásica. Por tanto, es importante realizar una revisión de los procedimientos de limpieza actuales y que se valide un protocolo que se ajuste a las necesidades de cada área para poder lograr la disminución de microorganismos presentes y evitar el posible ingreso de nuevos contaminantes, además se recomienda desplegar un proceso de monitoreo ambiental que garantice la reducción progresiva de organismos microbianos y así, poder garantizar la asepsia de la preparación.

### ABSTRACT

According to protocol, pharmaceuticals products should obey specifications determined by the Good Manufacturing Practices (GMP).

The microbiological quality of the environment where cancer chemotherapy is prepared is an essential factor for it to be carried with efficiency and safety. The safety of the cancer patient is depending a lot on the sterility of the product, as they are usually immunocompromised patients.

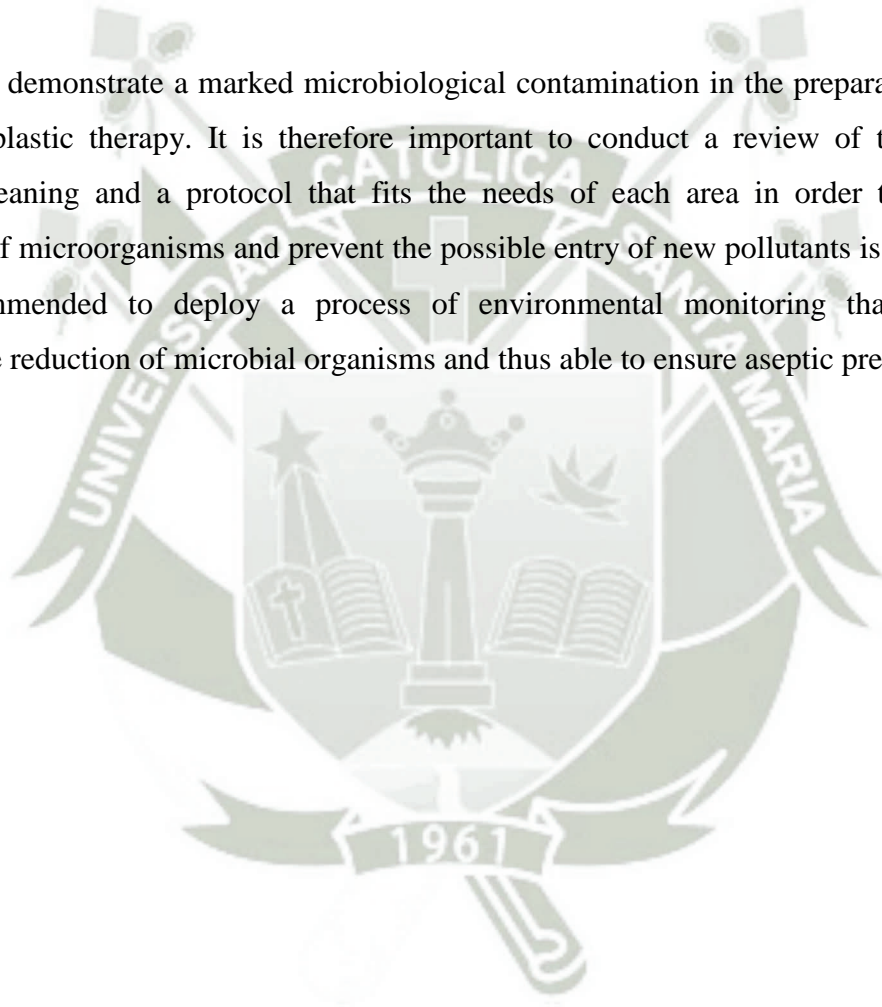
The objective of this study is to identify the number of colony forming units (CFU) of bacteria and fungi by observing morphology, the proper use of culture medium and enzymatic methods, which underwent some of the samples collected from Mixtures Cancer Unit (UMO) for the preparation of antineoplastic in the Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN-Sur).

The material was collected from the air, surfaces, water and hands of manipulators in seven different areas: conditioning area, preparation area, passage area, bathroom, wardrobe area, storage area and part of the room where patients are receiving chemotherapy.

Specimens of bacteria and fungi were identified by growth on selective media, macroscopic and microscopic morphology and enzymatic methods.

Most recorded corresponds to viable mesophilic microorganisms bacteria were found in proportion to the quality of each area. Fungal microorganisms identified were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Rhizopus* and *Absidia*, and bacterial microorganisms found were *Staphylococcus*.

The results demonstrate a marked microbiological contamination in the preparation processes of antineoplastic therapy. It is therefore important to conduct a review of the procedures existing cleaning and a protocol that fits the needs of each area in order to achieve the reduction of microorganisms and prevent the possible entry of new pollutants is validated, it is also recommended to deploy a process of environmental monitoring that ensures the progressive reduction of microbial organisms and thus able to ensure aseptic preparation.



## INTRODUCCIÓN

De manera tradicional el tratamiento del cáncer ha sido sobre todo quirúrgico, sin embargo, el advenimiento de nuevas modalidades terapéuticas, como radioterapia y quimioterapia, han modificado de forma radical el tratamiento inicial de numerosas formas de esta enfermedad. Hoy la terapéutica tiene carácter multidisciplinario.

Es así que, la quimioterapia citotóxica o terapia antineoplásica, es uno de los procedimientos más utilizados, consiste en el empleo de diversos agentes químicos que se administran de forma individual o combinada y además por diferentes vías (oral, subcutánea, intravenosa, intratecal).

En el procedimiento de su preparación y administración se debe tener en cuenta aspectos de protección ambiental, protección del manipulador y del paciente, ya que los errores que podrían suceder en esta fase del circuito serían difícilmente detectables en fases posteriores, por lo que es necesario hacer hincapié en la seguridad del proceso y los controles intermedios.

Entonces, los estudios de este tipo que evalúan la calidad microbiológica y la asepsia del ambiente donde se prepara y acondiciona la terapia antineoplásica, son de mucha importancia, ya que su desarrollo nos permite detectar posibles contaminantes microbianos y de acuerdo a los resultados se puede minimizar los riesgos, ya sea mejorando las instalaciones o revisando los procedimientos, todo eso con el fin de garantizar la seguridad del paciente y favorecer su supervivencia ya que normalmente son personas inmunosuprimidas con una aumentada sensibilidad a ciertas infecciones.

## HIPÓTESIS

Dado que existen antecedentes investigativos que revelan contaminación microbiana durante la elaboración y manipulación de preparados antineoplásicos; es probable que exista el mismo tipo de contaminación en el ambiente de la unidad de mezclas oncológicas (UMO) del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN-Sur).



## OBJETIVOS

1. Evaluar el número de UFC de bacterias y hongos del aire, superficies de trabajo, guantes del personal y agua potable del área de acondicionamiento.
2. Evaluar el número de UFC de bacterias y hongos del aire, superficies de trabajo, guantes del personal del área de preparación o reconstitución, en la que se ubica la cabina de seguridad biológica.
3. Evaluar el número de UFC de bacterias y hongos del aire, algunas superficies del área de paso, área de vestuario, cuarto de baño y área de almacenamiento.
4. Evaluar el número de UFC de bacterias y hongos del aire y superficies del área de recepción de quimioterapia.
5. Determinar en función de los resultados anteriores si las condiciones de calidad se cumplen o no de acuerdo a las buenas prácticas de manufactura que recomienda límites de contaminación microbiana.

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1. HIGIENE DE LA UNIDAD DE MEZCLAS ONCOLÓGICAS

El preparado oncológico puede contaminarse de diversas maneras, desde el momento de su elaboración hasta la aplicación del mismo. Para minimizar riesgos, se aplica un óptimo nivel de limpieza, cumpliendo de forma rigurosa lo detallado en la Guía de Manejo de Medicamentos Citostáticos. (2)

La limpieza de la sala tiene una doble finalidad:

- Mantener las superficies limpias de polvo para mantener la clase de la sala y minimizar la carga bacteriana.
- Descontaminación de trazas de citostáticos.

##### 1.1. Sistemática de limpieza:

Podemos distinguir dos tipos de limpieza: La limpieza rutinaria que se realiza con cada sesión de trabajo y la limpieza profunda, también llamada a veces descontaminación. (2, 3)

##### 1.1.1. Limpieza rutinaria:

Antes de comenzar cualquier sesión de trabajo se desinfectarán las superficies de trabajo con alcohol etílico o isopropílico de 70°. Una vez finalizada la sesión se procederá a limpiar la superficie de trabajo con agua jabonosa. Los citostáticos son

generalmente hidrosolubles, el alcohol no se considera adecuado para esta limpieza de arrastre, habiéndose demostrado más eficaz el uso de agua con un jabón alcalino. (2)

### **1.1.2. Descontaminación:**

Tiene como finalidad llevar a cabo una labor de arrastre de posibles restos de citostáticos. La persona que realice la limpieza se protegerá con bata cerrada por detrás, dos pares de guantes, gorro, gafas y mascarilla ya que puede ser necesario levantar el frontal de la cabina de seguridad biológica (CBS).

La limpieza se realizará con la CBS encendida y las partes móviles se limpiarán sin extraerlas del interior. Se procederá siempre desde las áreas de menor a mayor contaminación: paredes laterales de arriba abajo y luego superficie de trabajo desde el fondo hacia el exterior. Se utilizará agua jabonosa. La limpieza con alcohol 70° no se considera eficaz, ya que es necesaria la labor de arrastre de un buen agente limpiador (adecuado para acero inoxidable y de pH aproximado al del jabón). Se utilizarán siempre gasas o trapos húmedos.

Nunca se verterá directamente los líquidos sobre las superficies, ni se emplearán limpiadores en forma de spray ya que pueden afectar el buen funcionamiento de la CBS. Hay que poner especial atención en no mojar los filtros HEPA especialmente durante la limpieza de la superficie de trabajo. El último aclarado se realizará con abundante agua destilada o desionizada. Tras finalizar la limpieza se pasarán las superficies con alcohol de 70°. El material utilizado en la limpieza debe considerarse como material contaminado a la hora de su desecho. (2)

### **1.2.Límites recomendados para contaminación microbiana.**

Se describe la preparación aséptica de soluciones en grado A.

Los límites recomendados para el monitoreo microbiológico de ambientes limpios se muestran en la Tabla 1-1 y son determinados por la Convención de Inspección Farmacéutica (4).

**TABLA 1-1**  
**Límites recomendados para contaminación microbiana (5)**

<b>Grado</b>	<b>Muestras de aire 3 UFC/m<sup>3</sup></b>	<b>Sedimentación en placas (diám. 90 mm). UFC/4 h</b>	<b>Placas de contacto (diám. 55 mm). UFC/placa</b>	<b>Prueba de contacto de guante (5 dedos) UFC/guante</b>
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	25	25	–
D	200	100	50	–

## **2. CONTAMINACIÓN MICROBIANA.**

### **2.1. Factores que condicionan las enfermedades infecciosas.**

Las enfermedades infecciosas son el resultado de la interacción entre los microorganismos, el hospedero humano y el medio ambiente como se muestra en la Figura 1-1.

La capacidad de los microorganismos de causar infección mediante sus factores virulentos, la capacidad inmune y no inmune del hospedero para defenderse y su susceptibilidad genética, y el medio ambiente con sus factores físicos, culturales y económicos, son determinantes en la frecuencia, el predominio o el control de las enfermedades infecciosas en la población humana.

En la actualidad el control de muchas de las enfermedades infecciosas es posible gracias al conocimiento que se tiene de los agentes causales y la forma como se defiende de ellas el organismo humano. (6)

## **2.2.Flora microbiana normal**

Existe una flora comensal de bacterias y hongos variable y característica de cada zona particular colonizada (Ver Tabla 1-3).

No obstante la flora normal es capaz de producir infección en caso de inmunodepresión (Ver tabla 1-2).

Portador sería aquel sujeto colonizado de manera transitoria o permanente por algún microorganismo con potencial patógeno y que puede ser fuente de infección para sí mismo y para los demás. Son estériles: sangre, SNC, alvéolos pulmonares, hígado, bazo, riñón, vejiga, útero, trompas de Falopio, oído medio, senos paranasales y tejidos. (6)

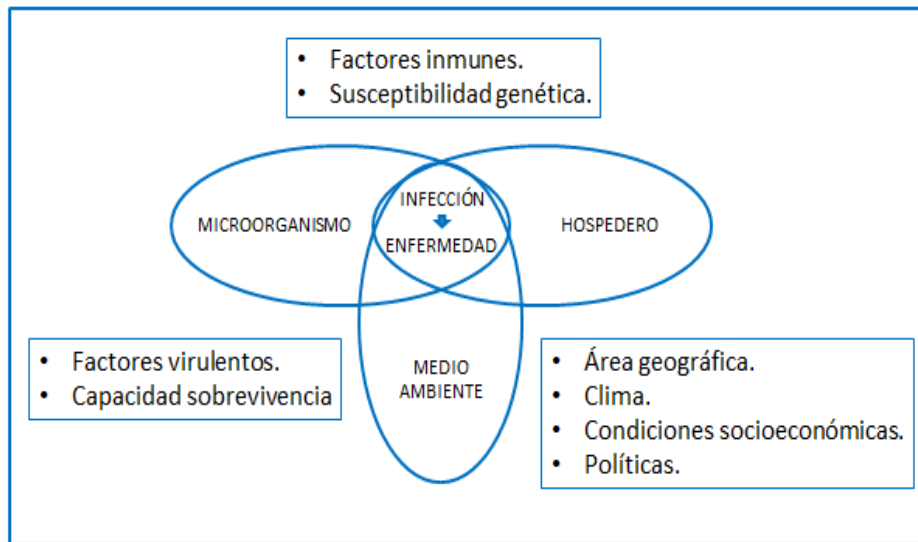
## **2.3.Bacterias.**

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división simple o fisión binaria. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. Para realizar una clasificación preliminar de las bacterias se utiliza su tamaño, forma y disposición espacial. El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras

algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de manera permanente. (7)

**FIGURA 1-1**

**Factores que condicionan las enfermedades infecciosas. (6)**



**2.3.1. Forma y agrupaciones de células bacterianas**

Algunas bacterias pueden ser de forma esférica y se les denomina cocos. Los cocos pueden agruparse de diversas maneras, si se disponen en forma de cadenas se les denomina estreptococos, si se disponen en forma de racimos se les denomina estafilococos o pueden estar en pares y se les denomina diplococos.

Las bacterias también pueden tener forma de bastón y reciben el nombre de bacilos. Los bacilos curvados que presentan espirales se llaman espirilos, algunas bacterias en espiral presentan formas fácilmente reconocibles, como las espiroquetas, semejantes a un tornillo o sacacorchos.

Las bacterias que carecen de pared celular tienen gran plasticidad (micoplasmas) y adoptan una variedad de formas. Ver Figura 1-2

Las bacterias esféricas tienen un tamaño promedio de 1 micrómetro de diámetro, mientras que los bacilos miden 1.5 de ancho por 6 micrómetros de largo. (8)

**TABLA 1-2.**

**Resumen de miembros de la flora normal y sus localizaciones anatómicas (9)**

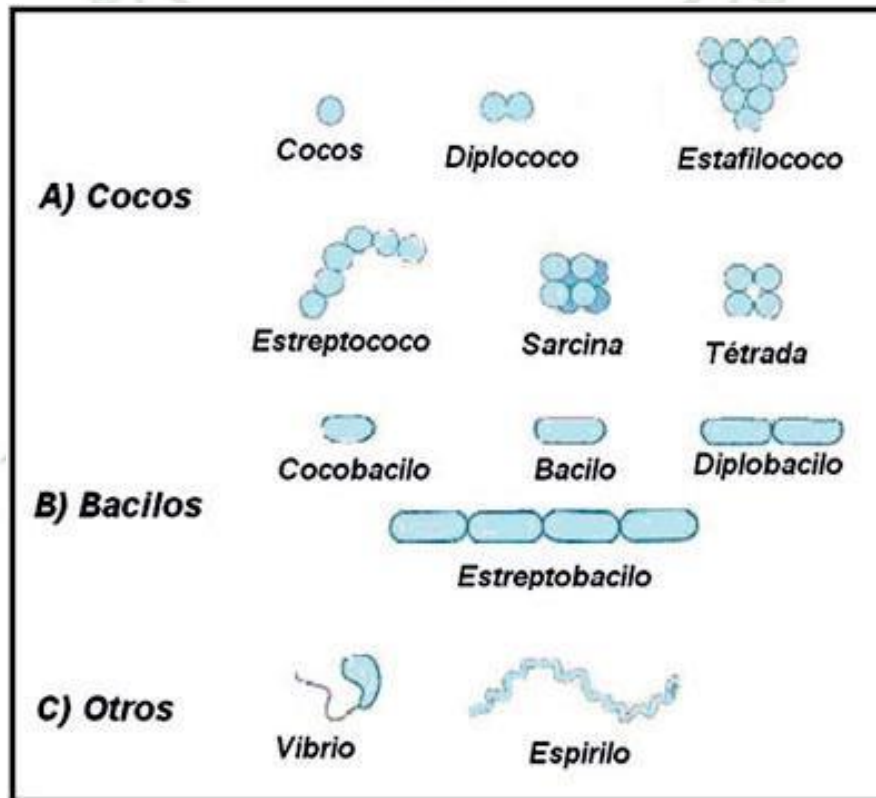
<b>MIEMBROS DE LA FLORA NORMAL</b>	<b>LOCALIZACIONES ANATÓMICAS</b>
<i>Bacteroides spp.</i>	Colon, garganta, vagina.
<i>Candida albicans</i>	Boca, colon, vagina.
<i>Clostridium spp.</i>	Colon.
<i>Corynebacterium difteriae</i>	Nasofaringe, piel, vagina.
<i>Escherichia coli</i> y otros coliformes	Colon, vagina, uretra externa.
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Vagina.
<i>Haemophilus spp.</i>	Nasofaringe, conjuntiva.
<i>Lactobacillus spp.</i>	Boca, colon, vagina.
<i>Neisseria spp.</i>	Boca, nasofaringe.
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Colon, piel.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nariz, piel.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Piel, nariz, boca, vagina, uretra.
<i>Streptococcus faecalis</i>	Colon
<i>Streptococcus viridans</i>	Boca, nasofaringe.

**2.3.2. Enterobacterias**

Es el grupo más grande y heterogéneo de bacilos gramnegativos con importancia clínica. Se han descrito 40 géneros con más de 150 especies. A pesar de la complejidad de esta familia, menos de 20 especies son las responsables de más del 95% de las infecciones.

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, se encuentran en el suelo, el agua, la vegetación y también en la flora intestinal normal de muchos animales, incluido el ser humano. Algunos microorganismos (*Salmonella typhi*, *Shigella*, *Yersinia pestis*) se asocian siempre a enfermedad, mientras que otros (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) forman parte de la microflora comensal normal y pueden producir infecciones oportunistas. (7)

**FIGURA 1-2**  
**Forma y agrupaciones de células bacterianas (8)**



### 2.3.2.1. Fisiología y estructura

Las Enterobacterias son bacilos gramnegativos de tamaño intermedio (0,3 a 1 por 1 a 6  $\mu\text{m}$ ). Comparten un antígeno común, pueden ser inmóviles o móviles con flagelos peritricos, y no forman esporas.

Los miembros pueden ser aerobios o anaerobios facultativos y pueden crecer en varios medios selectivos y no selectivos también.

**TABLA 1-3**

**Miembros medicamente importantes de la flora normal (9)**

LOCALIZACIÓN	ORGANISMOS IMPORTANTES
Piel	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Nariz	<i>Staphylococcus aureus</i>
Boca	<i>Streptococcus viridans</i>
Placa dental	<i>Staphylococcus mutans</i> , <i>Streptococcus salivarium</i>
Hendiduras gingivales	<i>Fusobacterium</i> , <i>Actinomices</i> .
Garganta	<i>Streptococcus viridans</i>
Colon	<i>acteroides fragilis</i> , <i>Escherichia coli</i>
Vagina	Lactobacillus, <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>

La familia Enterobacteriaceae tiene requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa, reducen los nitratos, son catalasa-positivos y oxidasa-negativos. Tan sólo existen algunas excepciones a esta regla (*Plesiomonas shigelloides* es una especie oxidasa-positiva; *Klebsiella granulomatis* no se puede cultivar en medios convencionales).

Las características de las colonias de estos microorganismos en los diferentes medios se han utilizado para distinguir a los miembros más frecuentes de la familia Enterobacteriaceae. Por ejemplo, la capacidad de fermentar lactosa se ha utilizado para distinguir a las cepas fermentadoras de lactosa (*Escherichia*, *Klebsiella*,

*Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratía*) de las cepas que no fermentan lactosa o lo hacen lentamente (*Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia spp.*).

La resistencia a las sales biliares en algunos medios selectivos se ha utilizado para separar a los patógenos entéricos (*Shigella*, *Salmonella*) de los microorganismos comensales que se inhiben con las sales biliares (bacterias grampositivas y algunas gramnegativas que están presentes en el aparato digestivo).

Algunas enterobacterias tienen cápsulas prominentes (algunas cepas de *Enterobacter* y *Escherichia*), mientras que otras están rodeadas de una capa viscosa difusible y suelta. (7)

### 2.3.3. *Staphylococcus* y microorganismos relacionados

La mayor parte de los estafilococos tiene un diámetro de entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  y son anaerobios facultativos (es decir, crecen aerobia y anaerobiamente) inmóviles capaces de crecer en un medio con una elevada concentración de sal (cloruro sódico al 10%) y a temperaturas desde 18 hasta 40 °C.

Estas bacterias están presentes en piel y mucosas del ser humano. Algunas especies se desarrollan en nichos muy específicos en los que se encuentran habitualmente. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* coloniza las narinas anteriores, *Staphylococcus capitis* crece en regiones con glándulas sebáceas (como la frente) y *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus hominis* se hallan en zonas dotadas de glándulas apocrinas (como la axila).

Las bacterias del género *Staphylococcus* conforman un importante grupo de patógenos en el ser humano y originan un amplio espectro de enfermedades sistémicas que pueden poner en peligro la vida, infecciones de la piel, las partes blandas, los huesos y el aparato genitourinario e infecciones oportunistas.

Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedad en el ser humano son *Staphylococcus aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

Las colonias de *Staphylococcus aureus* son doradas debido a los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. Igualmente, representa la única especie colonizadora del ser humano que produce la enzima coagulasa. Cuando se suspende una colonia de *S. aureus* en un tubo con plasma, la coagulasa se une a un factor sérico y el complejo convierte el fibrinógeno en fibrina, lo que da lugar a un coágulo. Dado que las restantes especies estafilocócicas carecen de la capacidad de producir coagulasa, son conocidas colectivamente como estafilococos coagulasa negativos (10).

## 2.4. Hongos

A diferencia de las bacterias, la estructura celular de los hongos es más compleja. Son microorganismos eucariotas que poseen un núcleo bien definido, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico. (7)

### 2.4.1. Importancia de los hongos

Los hongos representan un grupo ubicuo y diverso de microorganismos que se dedica principalmente a la degradación de materia orgánica. Los hongos llevan una vida heterotrófica como saprofitos, simbiotes, comensales o parásitos.

A lo largo de las dos últimas décadas, los hongos se han convertido en una importante causa de enfermedad en el ser humano, en especial en los sujetos inmunodeprimidos. En estos grupos de pacientes, los hongos actúan como patógenos oportunistas que originan una considerable morbimortalidad.

La incidencia global de las micosis invasivas específicas continúa incrementándose con el paso del tiempo y el listado de patógenos fúngicos oportunistas se amplía igualmente cada año. El aumento del número de infecciones por hongos puede atribuirse al número creciente de pacientes inmunodeprimidos, como los sujetos receptores de un trasplante, los afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), los aquejados de cáncer y los sometidos a quimioterapia, así como las personas hospitalizadas con otros trastornos graves de base y las que se someten a diversas intervenciones invasivas. (11)

#### **2.4.2. Taxonomía, estructura y replicación**

La taxonomía clásica de los hongos se ha basado, en gran medida, en la morfología y la forma de producción de esporas; sin embargo, hoy en día se tienen cada vez más en cuenta sus características ultraestructurales, bioquímicas y moleculares, las cuales obligan a modificar la designación taxonómica inicial.

La clasificación más sencilla, cimentada en aspectos morfológicos, agrupa a los hongos en levaduras y formas miceliales.

Desde el punto de vista morfológico, una levadura se define como una célula capaz de replicarse de manera asexual mediante gemación o fisión, de modo que la célula progenitora o madre se desprende de una porción de sí misma para producir una célula descendiente o hija. Las células hijas pueden alargarse para formar pseudohifas semejantes a salchichas.

Por lo general, las levaduras son unicelulares y producen colonias redondeadas, pálidas o mucoides en las placas de agar.

Por su parte, las formas miceliales son microorganismos pluricelulares formados por unas estructuras tubulares semejantes a hebras conocidas como hifas cuyos extremos se alargan mediante un proceso denominado extensión apical. Las hifas

pueden ser cenocíticas (huecas y multinucleadas) o septadas (divididas por tabiques). El conjunto de hifas conforma una estructura semejante a un tapete llamada micelio.

A menudo, las colonias formadas por las formas miceliales se describen como filamentosas, vellosas o lanosas. Cuando crecen en agar o sobre la superficie de otros medios sólidos, las formas miceliales producen unas hifas, denominadas hifas vegetativas, que crecen por encima o por debajo de la superficie del medio de cultivo, así como hifas que se proyectan por encima de la superficie y se conocen como hifas aéreas. Las hifas aéreas pueden producir unas estructuras especializadas, las conidias (elementos de reproducción asexual).

Las conidias se transmiten fácilmente por el aire y se encargan de la diseminación del hongo. La morfología, el tamaño y ciertas características del desarrollo de las conidias permiten asignar un hongo a un género y una especie concreta.

Casi todos los hongos son aerobios, aunque algunos son anaerobios (fermentadores) facultativos y otros son anaerobios estrictos.

En comparación con las bacterias, los hongos son seres de crecimiento lento cuyos tiempos de duplicación celular alcanzan horas en lugar de minutos. (7, 12)

#### 2.4.3. *Aspergillus*

Se conocen unas 900 especies de *Aspergillus*, que Rapper y Fennell clasifican en 18 grupos, de los que sólo 12 se relacionan con enfermedad humana: *Aspergillus fumigatus* (85%), *Aspergillus flavus* (5-10%), *Aspergillus niger* (2-3%), *Aspergillus terreus* (2-3%), *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus cervinus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus flavipes* y *Aspergillus ustus*.

Esta clasificación se basa en características morfológicas del hongo, tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y en la presencia de células de Hülle y de esclerocios. (8)

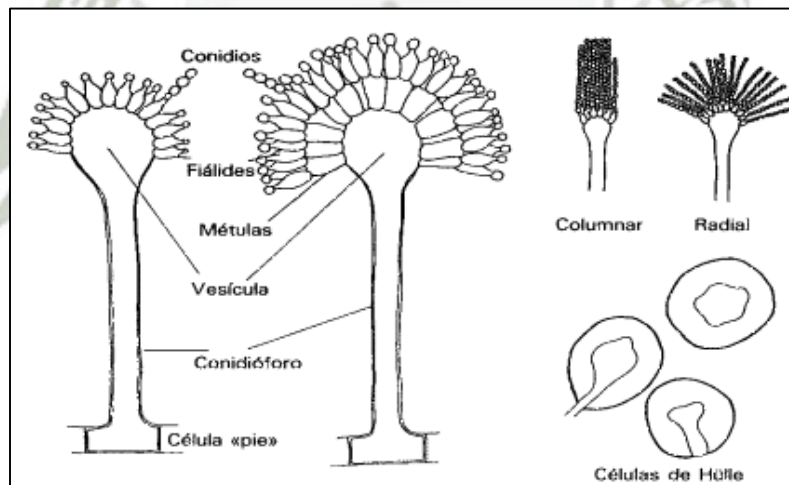
Observar la Figura 1-3 y la Tabla 1-4.

#### 2.4.3.1. Etiopatogenia:

*Aspergillus* es un ejemplo de lo que denominamos "patógeno oportunista", es decir, que suele afectar a pacientes con mecanismos de defensa comprometidos. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran:

**FIGURA 1-3**

#### **Características microbiológicas de *Aspergillus* (13)**



- El pequeño tamaño de sus conidias que permite que sean aspiradas y que pueda causar infección en el pulmón y en los senos paranasales.
- Su capacidad de crecer a 37°C, lo que le hace idóneo para afectar al humano.
- Su capacidad de adherencia a superficies epiteliales y posiblemente endoteliales y su gran tendencia a invadir los vasos sanguíneos.

- La producción de un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células de los mamíferos (elastasa, restrictocina, fumigatoxina, etc.). (8)

#### 2.4.3.2. Manifestaciones Clínicas:

Es esencial reconocer que *Aspergillus* puede ser un colonizador, causar enfermedad alérgica, infección local o ser responsable de cuadros invasivos de gran gravedad.

Es labor del microbiólogo obtener la información clínica necesaria para poder diferenciar estas situaciones. Algunas de las infecciones causadas por este microorganismo son:

- Onicomycosis: No es demasiado frecuente. (*A. fumigatus* y *A. versicolor*).
- Sinusitis alérgica: Los senos paranasales están ocupados por moco rico en eosinófilos, cristales de Charcott-Leyden e hifas.
- Otomicosis: Producidas principalmente por *A. niger* y *A. fumigatus*. Puede aparecer prurito local y vértigo.
- Aspergilomas: Producidos por colonización de cavidades previas (tuberculosis, sarcoidosis, histoplasmosis o bronquiectasias) por *Aspergillus*.
- Aspergilosis pulmonar invasiva: En los últimos años la incidencia de aspergilomas ha disminuido, mientras que la aspergilosis pulmonar invasiva (API) ha ido en aumento.
- Aspergilosis broncopulmonar alérgica: Suele deberse a la inhalación de conidias e hifas de *Aspergillus*.
- Aspergilosis pulmonar necrosante crónica: Suele afectar a ancianos con enfermedades pulmonares previas. Tiene un curso lento (meses o años).
- Sinusitis: La rinosinusitis aguda afecta, sobre todo, a pacientes muy inmunodeprimidos, mientras que la crónica puede aparecer en pacientes inmunocompetentes. (14)

**TABLA 1-4**

**Características morfológicas más importantes de las especies de *Aspergillus* (13)**

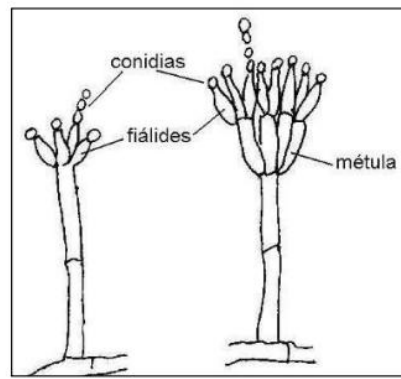
Especie	Aspecto macroscópico		Aspecto microscópico		Comentarios
	Micelio	Reverso	Conidióforo	Fiálides	
<i>A. fumigatus</i>	Aterciopelado o aspecto de polvo. Color blanquecino que cambia a verde oscuro o gris	Blanco a marrón-rojizo	Cortos (<300µm) y lisos	Uniseriadas sobre el tercio superior de la vesícula, paralelos al eje del conidióforo	
<i>A. flavus</i>	Aterciopelado. Color amarillo verdoso o marrón	Dorado a marrón-rojizo	Longitud variable y rugosos	Uniseriadas o biseriadas que cubren completamente la vesícula	
<i>A. niger</i>	Lanoso. Color blanco-amarillento que cambia a negro	Blanco amarillento	Largos y lisos	Biseriadas que cubren completamente la vesícula	
<i>A. terreus</i>	Aterciopelado. Color canela	Blanco a marrón	Cortos (<250m) y lisos	Biseriadas agrupándose en forma tubular	Aparecen células hialinas redondas en el micelio sumergido en el agar
<i>A. versicolor</i>	Aterciopelado.	Color blanco que cambia a amarillo, naranja, marrón-rojizo, verde o rosa Blanco, amarillo, naranja o rojo	Largos y lisos	Biseriadas y vagamente radiadas cubriendo la mayoría de las vesículas	En ocasiones se visualizan células de Hülle
<i>A. nidulans</i>	Aterciopelado. Color verde. Cuando presenta cleistotecios color similar al delante	Púrpura oscuro	Cortos (<250µm), lisos y marrones	Biseriadas	Cleistotecios con ascosporas de color rojizo. Habitualmente se observan células de Hülle
<i>A. glaucus</i>	Aspecto similar al fieltro. Color verde con zonas amarillentas	Amarillo a marrón	Longitud variable y lisos	Uniseriadas que cubren toda la vesícula	Cleistotecios frecuentemente presentes
<i>A. clavatus</i>	Aspecto similar al fieltro. Color verde-azulado	Blanco que suele cambiar a marrón	Largo y liso	Uniseriadas	Gran tamaño de la vesícula (200x40 µm) y de forma alargada

#### 2.4.4. *Penicillium*

Colonias de crecimiento rápido y abundante, de aspecto variable, afelpado, algodonoso o pulverizado, de colores diversos que van del blanco, azul-verdoso a verde olivo.

**FIGURA 1-4**

**Características microbiológicas de *Penicillium*. (13)**



Micelio vegetativo con hifas septadas coloreadas o hialinas; micelio reproductor diferenciado a partir de las hifas vegetativas, formando los conidióforos simples o ramificados simétricos, que dan lugar a las ramas o métulas en cuyos extremos se tienen los esterigmas o fiálides, los cuales sostienen a las conidias dispuestas en cadenas.

Conidias unicelulares hialinas o coloreadas, globosas y ovoides, de contorno liso o irregular. Género ampliamente distribuido en todos los ambientes teniendo especies saprófitas y parásitas. (8)

#### 2.4.5. *Rhizopus*

Es un género de mohos que incluyen especies cosmopolitas de hongos filamentosos hallados en el suelo, degradando frutos y vegetales, heces animales, y

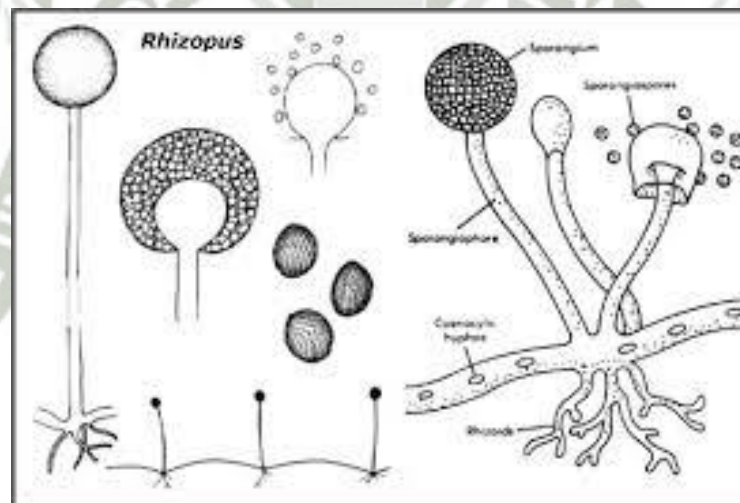
residuos. Las especies de *Rhizopus* producen esporas asexuales y sexuales. Sus características microbiológicas se observan en la Figura 1-6.

Las esporangiosporas asexuales se producen dentro de una estructura aguzada, el esporangium, y son genéticamente idénticas a su padre.

En *Rhizopus*, el esporangio es soportado por una gran columela apofisada, y el esporangióforo asoma entre rizopodes distintivos. Zigosporas negras se producen después de dos fusiones compatibles de micelios durante la reproducción sexual. Y hacen colonias que pueden ser genéticamente diferentes de sus padres. (9)

**FIGURA 1-5**

**Características microbiológicas de *Rhizopus*. (13)**



#### 2.4.6. *Absidia*

Las especies de *Absidia* son cosmopolitas y ubicuas en la naturaleza, se encuentran generalmente como contaminantes ambientales, en vegetales y suelo, y pueden ser aislados de alimentos y aire de ambientes cerrados.

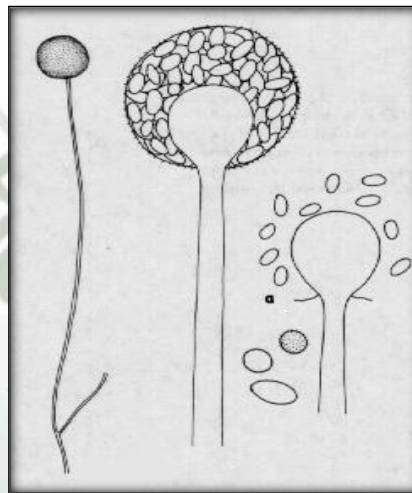
Sus características microscópicas se observan en la Figura 1-7.

Este género contiene 21 especies, siendo la más frecuentemente aislada y la única especie considerada patógena *Absidia corymbifera*.

Las colonias se caracterizan por ser algodonosas, laxas, de color blanco a gris, con micelio aéreo con puntos grises oscuros, que cubren la caja de Petri. (9)

**FIGURA 1-6**

**Características microbiológicas de *Absidia* (13)**



**2.4.7. *Fusarium***

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas. Pueden causar infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, con una alta mortalidad. Algunas de sus especies producen toxinas que afectan al hombre y animales.

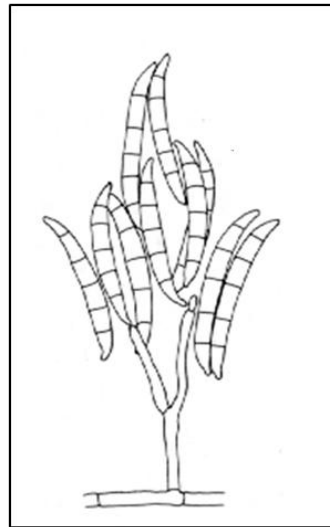
Al microscopio, la fiálide es generalmente fina, con forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados.

Para su correcta clasificación es importante el largo, ancho, curvatura, septos, agrupaciones mucoides (esporoquios) y detalles de las células de los extremos (célula apical y pie).

Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”), en cadenas largas o cortas; todas observables al microscopio (40x). Otro tipo de conidios son los mesoconidios, que son similares pero de menor tamaño que los macroconidios y nunca forman estructuras mucoides. Por último, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo. (9)

**FIGURA 1-7**

**Características microbiológicas de *Fusarium*. (13)**



#### **2.4.8. Dematiáceos**

La presencia de saprobios dematiáceos se puede sospechar en un cultivo en el que se observan colonias de color gris oscuro, marrón o negro, con aspecto veloso o aterciopelado, cuyo reverso es también pigmentado.

**TABLA 1-5**  
**Características de *Alternaria* y *Cladosporium*. (13)**

<b>GÉNERO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS</b>	<b>CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS</b>
<p><b><i>Alternaria</i></b> (Ver figura 1-9)</p>	<p>Hifas de color amarillo castaño claramente septadas.</p> <p>Formación de cadenas de macroconidias multicelulares que están separadas por tabiques transversales y longitudinales (muriforme).</p> <p>Las macroconidias tienen forma similar a palillos de tambor, con el cabo elongado de una conidia apoyado contra el extremo redondeado, como de la siguiente.</p>	<p>Micelio aéreo denso, algodonoso, bien desarrollado. Color inicial blanco grisáceo que pronto cambia el marrón oscuro a rojo purpura. Bordes enteros bien nítidos.</p> <p>Reverso rojo purpura a negro.</p>
<p><b><i>Cladosporium</i>. (15)</b> (Ver figura 1-10)</p>	<p>Hifas de color amarillo castaño, claramente septadas.</p> <p>Conidióforos libremente ramificados con aspecto de pincel, de cuyos extremos parten largas cadenas de pequeños conidios oscuros, ovales o elípticos, color amarillo castaño.</p>	<p>Colonias color marrón intenso a negro, lisas, coriáceas y rugosas, o bien variantes aterciopeladas, color verde intenso, cubiertas por un micelio bajo y veloso. Las primeras colonias pueden ser lisas y del tipo de levaduras.</p>

Las colonias jóvenes tienen a menudo consistencia de levaduras antes de que el micelio aéreo bajo comience a desarrollar.

La identificación presuntiva en base a la morfología colonial puede ser confirmada al microscopio por la presencia de hifas septadas de color amarillo oscuro a marrón.

En la Tabla 1-4 se describen características de *Cladosporium* y *Alternaria* y en las Figuras 1-9 y 1-10 se observa su morfología. (13)

#### 2.4.8.1. Géneros de hongos Dematiáceos:

Los saprobios dematiáceos más comúnmente hallados en los laboratorios clínicos son:

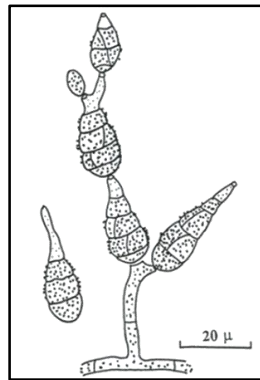
- *Curvularia*
- *Helminthosporium*
- *Heterosporium*
- *Alternaria*
- *Stemphylium*
- *Nigrospora*
- *Cladosporium*
- *Aureobasidium*

#### 2.4.8.2. Cuadro Clínico:

Estos hongos rara vez producen enfermedades humanas invasoras, si bien se cree que están asociadas con enfermedades alérgicas de las vías respiratorias superiores e inferiores. Sus contrapartes de desarrollo más lento, pertenecientes a los géneros *Phialophora*, *Fonseca* y *Cladosporium*, causan cromomicosis y algunas formas de micetoma en el hombre, enfermedades infrecuentes. (13)

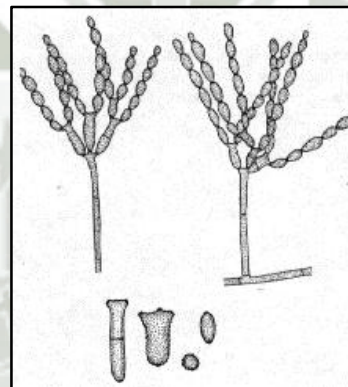
**FIGURA 1-8**

**Características microbiológicas de *Alternaria*. (13)**



**FIGURA 1-9**

**Características microbiológicas de *Cladosporium*. (13)**



### **3. MEDIOS DE CULTIVO.**

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en laboratorio. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes. El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a ebullición y se solidifica al enfriarse a 40 °C. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es degradado por aquellas que crecen en él.

En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. Los hidratos de carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos.

El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes. También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras. (16)

### **3.1. Condiciones generales para el cultivo de microorganismos**

#### **3.1.1. Disponibilidad de nutrientes adecuados**

Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ha de contener, como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas.

En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento. Siempre han de estar presentes las sustancias adecuadas para ejercer de donantes o captadores de electrones para las reacciones químicas que tengan lugar. Todas estas sustancias se suministraban originalmente en forma de

infusiones de carne, extractos de carne o extractos de levadura. Sin embargo, la preparación de estas sustancias para su aplicación a los medios de cultivo provocaba la pérdida de los factores nutritivos lábiles.

Actualmente, la forma más extendida de aportar estas sustancias a los medios es utilizar peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón ya que la mayoría de los microorganismos, que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno presentes en la peptona.

Ciertas bacterias tienen necesidades nutritivas específicas por lo que se añade a muchos medios sustancias como suero, sangre, líquido ascítico, etc.

Igualmente pueden ser necesarios ciertos carbohidratos y sales minerales como las de calcio, magnesio, manganeso, sodio o potasio y sustancias promotoras del crecimiento, generalmente de naturaleza vitamínica.

Muy a menudo se añaden al medio de cultivo ciertos colorantes, bien como indicadores de ciertas actividades metabólicas o bien por sus capacidades de ejercer de inhibidores selectivos de ciertos microorganismos. (16)

### **3.1.2. Consistencia adecuada del medio**

Partiendo de un medio líquido podemos modificar su consistencia añadiendo productos como albúmina, gelatina o agar, con lo que obtendríamos medios en estado semisólido o sólido.

Los medios solidificados con gelatina tienen el gran inconveniente de que muchos microorganismos no se desarrollan adecuadamente a temperaturas inferiores al punto de fusión de este solidificante y de que otros tienen la capacidad de licuarla.

### **3.1.3. Presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases**

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos. Pero los microorganismos anaerobios estrictos sólo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental. En un punto intermedio, los microorganismos microaerófilos crecen mejor en condiciones atmosféricas parcialmente anaerobias (tensión de oxígeno muy reducida), mientras los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones. (16)

### **3.1.4. Condiciones adecuadas de humedad**

Un nivel mínimo de humedad, tanto en el medio como en la atmósfera, es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos. Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo a 35-37°C proporcionando una fuente adecuada de agua que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deseque el medio. (16)

### **3.1.5. Luz ambiental**

La mayoría de los microorganismos crecen mucho mejor en la oscuridad que en presencia de luz solar. Hay excepciones evidentes como sería el caso de los microorganismos fotosintéticos. (16)

### **3.1.6. pH**

La concentración de iones hidrógeno es muy importante para el crecimiento de los microorganismos. La mayoría de ellos se desarrollan mejor en medios con un pH

neutro, aunque hay los que requieren medios más o menos ácidos. No se debe olvidar que la presencia de ácidos o bases en cantidades que no impiden el crecimiento bacteriano pueden sin embargo inhibirlo o incluso alterar sus procesos metabólicos normales.

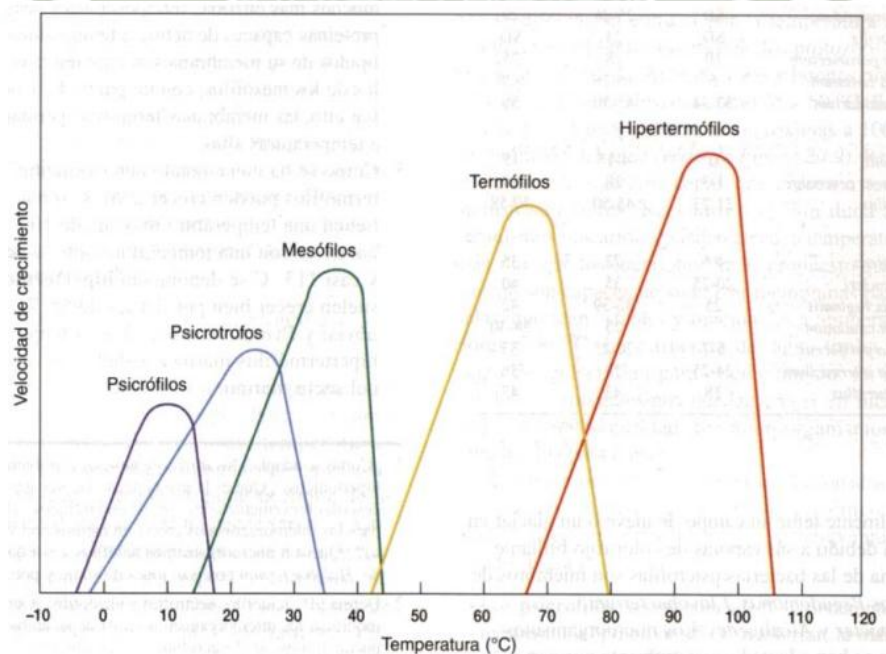
### 3.1.7. Temperatura

Los microorganismos mesófilos crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 43°C. Otros como los psicrófilos crecen a 0°C y los termófilos a 80°C o incluso a temperaturas superiores (hipertemófilos). En líneas generales, los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más cortos, alrededor de 37°C, y los saprofitos tienen rangos más amplios.

En la Figura 1-11 se pueden observar los rangos de temperatura para el crecimiento bacteriano. (16)

**FIGURA 1-10**

**Rangos de temperatura para el crecimiento bacteriano**



### **3.1.8. Esterilidad del medio**

Todos los medios de cultivo han de estar perfectamente estériles para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. El sistema clásico para esterilizar los medios de cultivo es el autoclave (que utiliza vapor de agua a presión como agente esterilizante). (16)

## **3.2. Tipos básicos de medios de cultivo**

### **3.2.1. Atendiendo a su estado físico**

#### **3.2.1.1. Medios de cultivo: Sólido y Líquido**

En ambos medios debe haber una buena cantidad de nutrientes que faciliten el crecimiento bacteriano y entonces ¿cuál es la diferencia? pues la diferencia radica en la presencia de una sustancia que se llama Agar y que es la encargada de darle la solidez y consistencia al medio. ¿Tiene alguna ventaja el uno sobre el otro? Pues la ventaja fundamental de usar un medio de cultivo líquido, es que permite que crezcan bacterias que se encuentran en muy poca cantidad, es decir, cuya concentración es muy baja en la muestra que estamos analizando. Para el caso del medio de cultivo sólido, la ventaja radica en que permite detectar los diferentes tipos de bacterias que puedan encontrarse en una sola muestra entonces el usar uno u otro medio de cultivo dependerá de lo que busque. (16)

#### **3.2.1.2. Medios semisólidos**

Se preparan a partir de los medios líquidos, agregando a éstos un agente solidificante en una proporción menor que para preparar medios sólidos. Uno de

sus usos es la investigación de la movilidad de las bacterias. (16)

### **3.2.2. Según su utilización**

#### **3.2.2.1. Medios comunes:**

Son aquellos que poseen los componentes mínimos para que pueda producirse el crecimiento de bacterias que no necesiten requerimientos especiales. (16)

#### **3.2.2.2. Medios de enriquecimiento:**

Son aquellos que, además de las sustancias nutritivas normales, incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes. Este enriquecimiento se hace por adición de sangre u otros productos biológicos (sangre, suero, leche, huevo, bilis, etc.) que aportan dichos factores. (16)

#### **3.2.2.3. Medios selectivos:**

Son medios utilizados para favorecer el crecimiento de ciertas bacterias contenidas en una población polimicrobiana. El fundamento de estos medios consiste en facilitar nutricionalmente el crecimiento de una población microbiana específica.

#### **3.2.2.4. Medios inhibidores:**

Cuando las sustancias añadidas a un medio selectivo impiden el crecimiento de una población microbiana, se denomina inhibidor. Los medios inhibidores podrían considerarse como una variante más restrictiva de los medios selectivos. Los medios inhibidores se consiguen habitualmente por adición de sustancias antimicrobianas o de cualquier otra que inhiba completamente el desarrollo de una población determinada. (16)

#### **3.2.2.5. Medios diferenciales:**

Se utilizan para poner en evidencia características para diferenciar géneros o especies. La adición de un azúcar fermentable o un sustrato metabolizable se utilizan para este fin. (16)

#### **3.2.2.6. Medios de identificación:**

Son los destinados a comprobar alguna cualidad específica que puede servirnos para reconocer la identidad de un microorganismo. Estos medios han de poseer los elementos necesarios para asegurar el crecimiento de los microorganismos, el sustrato específico que vaya a ser metabolizado y el indicador que nos muestre el resultado. (16)

#### **3.2.2.7. Medios de multiplicación:**

Sirven para obtener una gran cantidad de células a partir de un microorganismo ya aislado. (16)

#### **3.2.2.8. Medios de conservación:**

Se utilizan para conservar una cepa que, por diversas razones nos interese mantener. Fundamentalmente se utilizan como controles de calidad de las pruebas y reactivos utilizados en el laboratorio de microbiología. (16)

#### **3.2.2.9. Medios de transporte:**

Se usan para el transporte de muestras clínicas que no pueden sembrarse inmediatamente. Su utilización debe hacerse introduciendo la torunda con la que se obtuvo la muestra en el interior del medio (generalmente en un tubo). (16)

### **3.2.3. Atendiendo a su composición**

Según las sustancias que entren a formar parte en su composición, los medios de cultivo pueden ser clasificados en:

#### **3.2.3.1. Medios complejos:**

Fueron los primeros utilizados, y los más empleados se preparan a partir de tejidos animales, y más raramente de vegetales. Su composición no es exactamente definida, y por consiguiente no es rigurosamente constante. (16)

#### **3.2.3.2. Medios sintéticos:**

Son aquellos que contienen en su composición exclusivamente sustancias químicas conocidas y disueltas en agua destilada en proporciones determinadas, resultando un medio de composición perfectamente definida. (16)

#### **3.2.3.3. Medios semisintéticos:**

El gran número de factores de crecimiento exigidos para ciertos gérmenes hace que la fabricación de un medio sintético para estos gérmenes sea imposible o demasiado cara. En este caso se aportan los factores de crecimiento bajo la forma de un extracto orgánico complejo (extracto de levadura, extracto de tejidos, etc.).

### **3.3. Medios de cultivos comunes**

#### **3.3.1. Agar Tripticasa de soya (TSA):**

Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y

estrictos. El agregado de sangre, permite el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes y la observación de reacciones de hemólisis. (16)

### 3.3.2. Agar Mac Conkey:

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo. (16)

### 3.3.3. Agar SS:

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *Salmonella* spp. y de algunas especies de *Shigella* spp. a partir de heces, alimentos y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia. (16)

### 3.3.4. Agar Manitol Salado

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de diversas muestras. (16)

### 3.3.5. Agar Sabouraud

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras. (16)

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El trabajo de investigación fue realizado en el Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur.

La preparación de los medios, el cultivo, conteo e identificación de las muestras se realizó en el laboratorio de microbiología (H-403) de la Universidad Católica de Santa María.

#### 2. MATERIALES

##### 2.1. Material Microbiológico

La recolección de muestras se realizó en un día, fueron elegidas aleatoriamente durante la preparación de antineoplásicos en las diferentes áreas de la Unidad de Mezclas Oncológicas del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur.

##### 2.2. Material de Laboratorio

###### 2.2.1. Medios de cultivo

Agar Tripticasa de soya (MERCK).

Agar Mac Conkey (MICROGEN).

Agar SS (HIMEDIA).

Agar Manitol Salado (MERCK).

Agar Sabouraud (MERCK).

Placas petrifilm de crecimiento rápido para Hongos y Levaduras (3M).

Placas petrifilm para crecimiento de enterobacterias (3M).

#### **2.2.2. Material de vidrio y otros**

Probeta 100ml

Matraz Erlenmeyer 250ml

Tubos de vidrio 12 por 75mm

Placas Petri descartables 90mm

Láminas portaobjetos

Láminas cubreobjetos

Espátula

Gradillas

Asa de Kholle

#### **2.2.3. Reactivos de identificación**

Cristal Violeta

Lugol

Alcohol acetona

Zafranina

Azul de metileno

Aceite de inmersión

Peróxido de hidrogeno al 30%

#### **2.2.4. Equipos**

Balanza analítica. (A-160 Denver Instrument Company)

Autoclave. (Automat-35 WEBECO)

Mechero bunsen. (TESTER)

Microscopio (NIKON)  
Contador de colonias (QUEBEC)  
Estufa incubadora. (HERAEUS)

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Preparación de los medios de cultivo

Para los medios de Agar Tripticasa de soya (TSA), Mac Conkey (MC), Manitol Salado (MS) y Sabouraud (Sab):

Disolver la cantidad necesaria de polvo deshidratado de cada uno de los medios para 400 ml de agua destilada. Mezclar y dejar reposar por 5 minutos. Calentar suavemente agitando y hervir durante 1 o 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 118-121°C. Distribuir de forma uniforme en placas de Petri estériles.

Para Agar SS, el procedimiento es similar, pero, después de calentar a ebullición durante 2 o 3 minutos, **NO SE DEBE DE ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE**. Es preferible esperar a que el medio enfríe entre 45 y 50°C. Por último, distribuir unos 20 ml por placa. (16)

#### 3.2. Fundamento de los medios de cultivo

##### 3.2.1. Agar Tripticasa de soya (TSA):

La tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya aporta también carbohidratos que estimulan el crecimiento de muchos microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. (16)

**Fórmula (en gramos por litro)**

Tripteína	15.0
Peptona de soya	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
pH final:	7.3 ± 0.2

**3.2.2. Agar Mac Conkey:**

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares. (16)

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

**Fórmula (en gramos por litro)**

Peptona	17.0
Pluripeptona	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
pH final:	7.1 ± 0.2

### 3.2.3. Agar SS:

Es un medio de cultivo selectivo y diferencial. La selectividad, está dada por la sales biliares y el verde brillante, que inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor del *Proteus spp.* Es diferencial debido a la fermentación de la lactosa, y a la formación de ácido sulfhídrico a partir del tiosulfato de sodio.

Los pocos microorganismos fermentadores de lactosa capaces de desarrollar, acidifican el medio haciendo virar al rojo el indicador de pH, obteniéndose colonias rosadas o rojas sobre un fondo rojizo.

*Salmonella*, *Shigella* y otros microorganismos no fermentadores de lactosa, crecen bien en el medio de cultivo, y producen colonias transparentes. La producción de ácido sulfhídrico se evidencia como colonias con centro negro debido a la formación de sulfuro de hierro. (16)

#### Fórmula (en gramos por litro)

Pluripeptona	5.0
Extracto de carne	5.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	8.5
Citrato de sodio	8.5
Tiosulfato de sodio	8.5
Citrato férrico	1.0
Agar	13.5
Verde brillante	0.00033
Rojo neutro	0.025
pH final:	7.0 ± 0.2

### 3.2.4. Agar Manitol Salado

En el medio de cultivo, el extracto de carne, la peptona de carne y la tripteína, constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales que promueven el desarrollo microbiano. El manitol es el hidrato de carbono fermentable.

El cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, el rojo fenol es el indicador de pH y el agar es el agente solidificante.

Se trata de un medio altamente selectivo por la alta concentración salina y diferencial debido a la capacidad de fermentación del manitol por los microorganismos.

Las bacterias que crecen en un medio con alta concentración de sal y fermentan el manitol, producen ácidos, con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.

Los estafilococos crecen en altas concentraciones de sal, y pueden o no fermentar el manitol.

Los estafilococos coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color.

Los estafilococos que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas, rodeadas de una zona del mismo color o púrpura.

Este medio de cultivo es recomendado para el aislamiento de estafilococos patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria. (16)

**Fórmula (en gramos por litro)**

Extracto de carne	1.0
Peptona de carne	5.0
Tripteína	5.0
Manitol	10.0
Cloruro de sodio	75.0
Rojo de fenol	0.025
Agar	15.0
pH final:	7.4 ± 0.2

**3.2.5. Agar Sabouraud**

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo).

En el medio de cultivo, la peptona, la tripteína y la glucosa son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras. El agar es el agente solidificante.

Puede ser suplementado con otros agentes selectivos de crecimiento. (16)

**Fórmula (en gramos por litro)**

Peptona	5.0.
Tripteína	5.0.
Glucosa	40.0.
Cloranfenicol	0.05.
Agar	15.0.
pH final:	5.6 ± 0.2

### 3.3. Métodos de recolección de muestra

#### 3.3.1. Evaluación microbiológica de Aire

##### 3.3.1.1. Método de Sedimentación en placa

Consiste en dejar expuestas durante un tiempo determinado placas de Petri (90 mm de diámetro) con un medio de cultivo selectivo. Es uno de los más sencillos para la determinación de microorganismos del aire. A pesar de ello, los resultados obtenidos solo son orientativos de las cifras de microorganismos presentes en el aire, ya que estos niveles varían en función de las corrientes de aire y del tamaño de las partículas en suspensión. (17)

Los tiempos de exposición no deben ser extremadamente largos para evitar que se reseque la superficie de la placa. El resultado ha de expresarse como: UFC/cm<sup>2</sup>/hora. (18 y 19). El criterio de selección de medios de cultivo fue de la siguiente manera:

- Agar Tripticasa de soya (TSA) para la evaluación de mesófilos viables.
- Agar Mac Conkey (MC) para la evaluación de enterobacterias.
- Agar SS para la evaluación de *Salmonella* y *Shigella*.
- Agar Manitol Salado (MS) para la evaluación de *Staphylococcus*.
- Agar Sabouraud (Sab.) para la evaluación de levaduras y hongos.

#### 3.3.2. Evaluación microbiológica de Superficies, manos de manipulador y agua.

##### 3.3.2.1. Método de Contacto (Petrifilm)

Consiste en someter a contacto directo de las placas Petrifilm con los posibles microorganismos que se encuentren presentes en la superficie de mesas de trabajo

o las manos de manipuladores, también es ideal para una rápida toma de muestra líquida (1ml) debido a una sustancia gelificante que impide su derramamiento. Las placas Petrifilm son una extraordinaria herramienta para conteo y gestión de datos que puede disminuir los errores humanos y brinda resultados rápidos. Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron Placas Petrifilm para crecimiento de enterobacterias y Placas Petrifilm de crecimiento rápido para Hongos y Levaduras

### **3.4.Procedimiento de recolección de muestra**

Para la recolección de muestra se contó con el apoyo y participación de los químicos farmacéuticos encargados de la UMO del IREN-Sur. Se elaboró un sistema de codificación, enumerando las áreas y designando letras a lugares específicos dentro de cada área. De esta manera se trató de elaborar un sistema casi coreográfico a la hora de colocar Placas Petri para la evaluación de aire y al utilizar las placas petrifilm para superficies y agua. Sobre todo fue importante para que cada muestra tenga el rótulo correcto y se eviten posibles errores.

En la figura 2-1 se puede observar de forma más explícita la distribución de códigos:

- De negro los números en cada área.
- De rojo las letras para cada sector en cada área.
- Líneas azules para cada juego de cinco placas para el método de sedimentación.
- En círculos azules el número de placas Petrifilm.

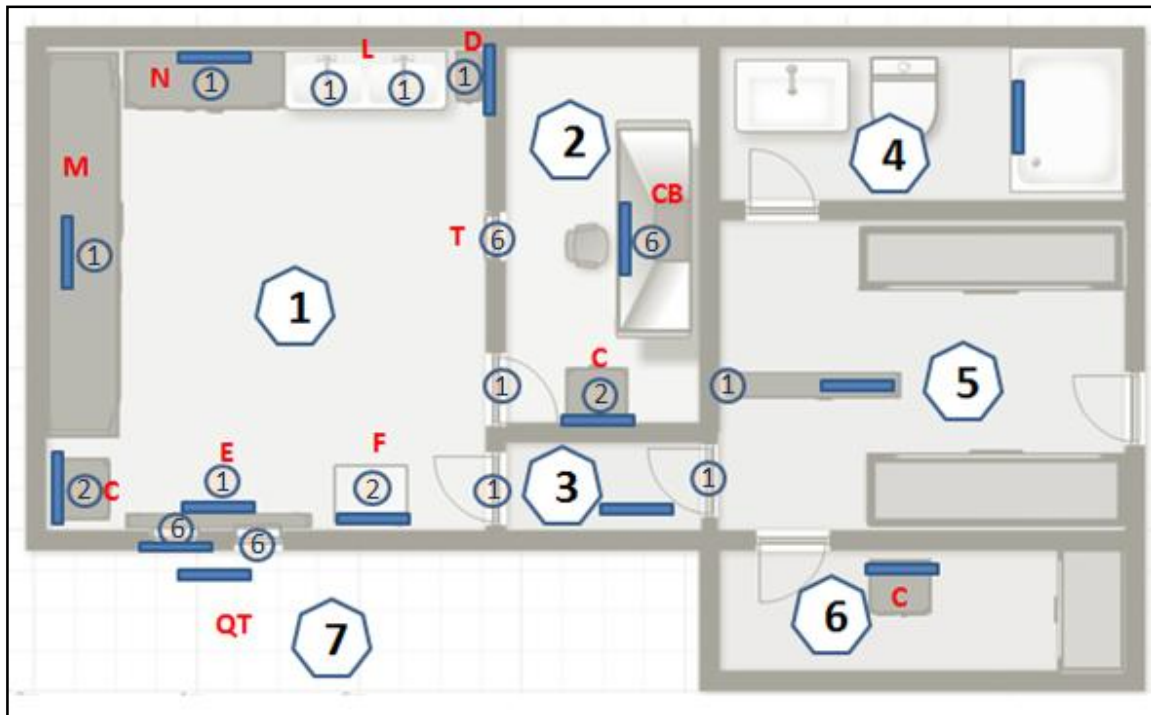
### **3.5.Conteo e identificación de muestras**

#### **3.5.1. Conteo de UFC**

Para el recuento de microorganismos en Placas de Petri y Placas Petrifilm se utilizará la observación en un contador de colonias.

**FIGURA 2-1**

**Designación de las áreas de la Unidad de Mezclas Oncológicas**



**3.5.2. Identificación de bacterias:**

**3.5.2.1. Tinción Gram para observación al microscopio**

- Con una aza de Kholle, colocar una pequeña muestra del cultivo y extenderla sobre una lámina portaobjetos.
- Dejar secar a temperatura ambiente o pasar por la llama suavemente para fijar el frotis, con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de Cristal Violeta.
- Luego de un minuto de exposición al cristal violeta, lavar con agua.
- Cubrir el preparado con Lugol durante un minuto. Lavar con agua.

- Sostener el portaobjeto entre el pulgar y el índice y lavar la superficie con el decolorante Alcohol-Acetona hasta no arrastrar más colorante violeta. Se requieren unos 10 segundos más o menos.
- Secar al aire a temperatura ambiente.
- Observar al microscopio a 100X y con aceite de inmersión.

Es una tinción diferencial que emplea secuencialmente dos colorante para distinguir dos tipos de microorganismos en función de sus diferencias en la pared celular.

La clave es el peptidoglicano, (las grampositivas lo poseen en mucha mayor proporción) ya que es el material que confiere rigidez a la pared celular bacteriana. La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración se debe a que la membrana externa de las gramnegativas es soluble en solventes orgánicos

Las bacterias grampositivas se visualizan de color azul-violeta y las gramnegativas de color rosado. (8)

### 3.5.2.2. Prueba de la Catalasa

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Químicamente la catalasa es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado ( $\text{Fe}^{+3}$ ). (13)

- Con un aza de Kholle, colocar en el centro de la lámina portaobjetos una colonia a investigar.
- Agregar una o dos gotas de peróxido de hidrógeno.
- Suspender el organismo y observar si hay la aparición de burbujas debido al desprendimiento del oxígeno.

Interpretación: La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva.

### 3.5.2.3. Prueba de la coagulasa

La coagulasa se halla presente en dos formas, libre y fija, cada una de ellas posee diferentes propiedades que requieren el uso de técnicas separadas.

Coagulasa Libre (Prueba en tubo), es una sustancia semejante a la trombina, que se halla presente en los cultivos de filtrados.

Coagulasa Fija (portaobjetos), conocida como factor de aglutinación está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en filtrados de cultivo. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en el plasma (fibrinógeno) provocan su aglutinación. Lo cual se indica por la aparición de agregados visibles en el portaobjeto. (13)

- Con un asa de kholle, colocar en el centro de una lámina portaobjetos una colonia a investigar.
- Agregar una o dos gotas de plasma humano o de conejo.
- Suspender el organismo e inclinar la lámina de un lado a otro y observar si hay la aparición de grumos.

### 3.5.3. Identificación de Mohos:

#### 3.5.3.1. Examen directo con KOH al 10% o Azul de metileno.

Colocar una gota de KOH al 10% o azul de metileno en un portaobjeto y mezclar con una pequeña cantidad del material a examinar (micelio aéreo proveniente del cultivo). (13)

- Colocar una lámina cubreobjeto (18 por 18mm) sobre la gota.
- Examinar microscópicamente en busca de características específicas de los diferentes tipos de mohos descritos en el marco teórico.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se realizó una evaluación microbiológica del ambiente (aire, superficies, agua y manos de manipuladores), de forma aleatoria en las diferentes áreas de la Unidad de Mezclas Oncológicas (UMO) del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Sur (IREN-Sur). La toma de muestra se realizó durante cuatro horas, mientras se llevaba a cabo la manipulación y preparación de antineoplásicos.

La UMO del IREN-Sur fue dividida en 7 áreas y cada área fue dividida en diferentes zonas para una mejor organización y codificación de las muestras.

FIGURA 3-1

Plano de la UMO del IREN-Sur



En la Figura 3-1 se observa la designación de áreas: **1** es el área de acondicionamiento, **2** es el área de preparación, **3** es un área de paso, **4** es el cuarto de baño, **5** es el área de vestuario, **6** es un área de almacenamiento y **7** representa a la sala de recepción de quimioterapia. Además, se observan las zonas dentro de cada área designadas por letras, donde **C** corresponde a los coches, **M** al mesón de apoyo, **N** al mesón de trabajo, **L** al lavatorio, **D** al mesón del contenedor, **T** a los transferes, **F** al refrigerador, **E** al estante de almacenamiento de bandejas y **QT** que representa a la zona más cercana que se encuentra en mayor contacto con la UMO.

Los principales contaminantes del aire y superficies son las esporas, hongos, bacterias, y virus que se originan en el aire externo e ingresan en el sistema de ventilación, en la infraestructura, el mobiliario y principalmente en sus ocupantes. Su presencia generalmente se debe a que estos microorganismos son considerados como parte de la microflora ambiental normal y además pueden comportarse como patógenos oportunistas, causando así enfermedades en individuos inmunodeprimidos.

## 1. MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS VIABLES

Para el recuento de aerobios mesófilos viables se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos (Figura 3-2).

**FIGURA 3-2**

**Microorganismos aerobios mesófilos viables hallados en medio TSA**



Se realizó por el método de sedimentación en placa con medio TSA. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Más adelante se puede observar su cuantificación por áreas.

## 2. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus*

**FIGURA 3-3**

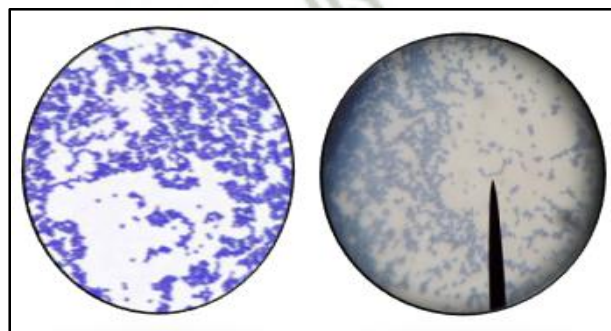
### **Crecimiento Bacteriano en Agar Manitol Salado**



Para la identificación de *Staphylococcus* se realizaron pruebas Gram, Catalasa y Coagulasa a los microorganismos que crecieron en el medio de Manitol Salado. Como muestra la Figura 3-3 se puede observar crecimiento de colonias color amarillo y blanco. Al observar las colonias blancas y amarillas al microscopio con Tinción Gram se ven cocos Gram positivos agrupados en racimos (Figura 3-4)

**FIGURA 3-4**

### **Cocos Gram positivos en racimos**



En la Figura 3-5 se observa que al someter los dos tipos de colonias a prueba de la Catalasa, ambas colonias evidenciaron aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia, lo que indica una reacción catalasa positiva.

**FIGURA 3-5****Prueba Catalasa positiva**

Al someter los dos tipos de colonias a prueba de la Coagulasa, se observó diferencias en la reacción: las colonias amarillas evidenciaron aparición de agregados visibles en el portaobjeto, lo que significa que son Coagulasa positivo (Figura 3-6); las colonias blancas no provocaron la aparición de agregados en el portaobjetos (Figura 3-7).

**FIGURA 3-6****Prueba Coagulasa positiva**

El género *Staphylococcus* se caracteriza por ser catalasa positivo, pero la diferencia de especies se revela gracias a la coagulasa ya que *Staphylococcus aureus* es coagulasa positivo y *Staphylococcus epidermidis* es coagulasa negativo. (Tabla 3-1)

**FIGURA 3-7**

**Prueba Coagulasa negativa**



*Staphylococcus* coagulasa negativos, están ampliamente distribuidos en el medio ambiente y son parte de la flora microbiana normal de la piel y mucosas de humanos y animales. A pesar de que se les considere como contaminantes ambientales normales, también pueden comportarse como patógenos oportunistas, causando enfermedades en individuos inmunodeprimidos (3).

**Tabla 3-1**

**Diferencias entre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.**

	<b>Catalasa</b>	<b>Coagulasa</b>
<b><i>Staphylococcus aureus.</i></b> Colonias amarillas	+	+
<b><i>Staphylococcus epidermidis.</i></b> Colonias blancas	+	-

*Staphylococcus* coagulasa positivos, considerado como uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales, puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones relativamente benignas, tales como foliculitis, conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal (presencia o ingesta de enterotoxina).

En cuanto a la identificación de hongos, la evaluación fue mediante observación macroscópica del micelio y el reverso de las colonias, también se realizó una observación microscópica con tinción de azul de metileno, es así que nueve diferentes tipos de mohos fueron identificados.

### 3. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

En la Figura 3-8 y 3-9 se muestra la morfología de *Penicillium*. La infección diseminada por *Penicillium marneffe*, es la forma más común de presentación de la peniciliosis, es un proceso grave de evolución fatal en ausencia de tratamiento, o cuando éste es instaurado tardíamente.

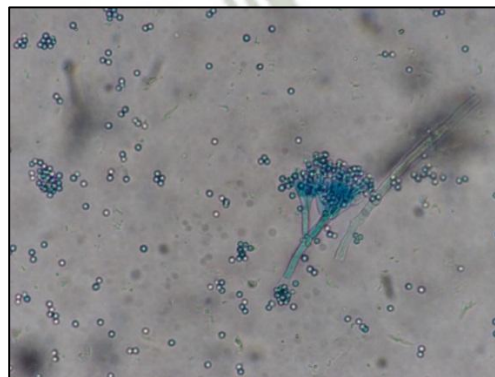
**FIGURA 3-8**

**Micelio y reverso de colonia de *Penicillium***



**FIGURA 3-9**

**Observación microscópica de *Penicillium***

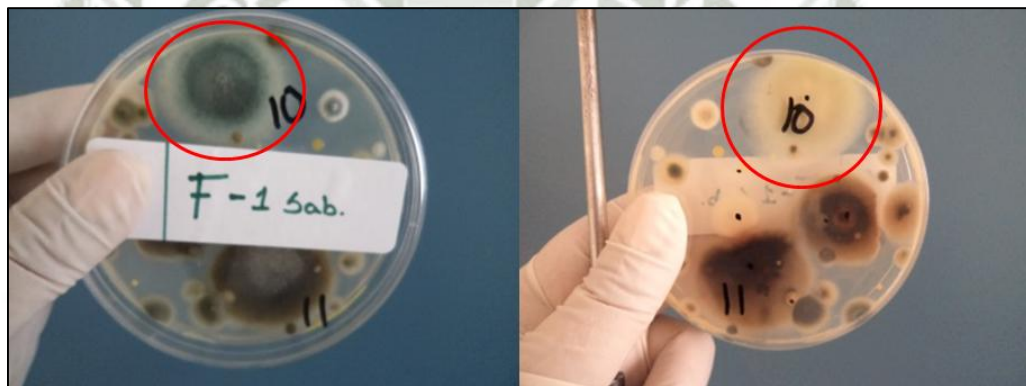


La peniciliosis ha sido descrita en pacientes con sida y en otros inmunodeprimidos. Las manifestaciones clínicas no son específicas y en los pacientes infectados por el VIH pueden confundirse con otras infecciones oportunistas. Comúnmente, se presenta como una enfermedad diseminada con fiebre, pérdida de peso y anemia. Los pacientes presentan lesiones cutáneas, semejantes al *Molluscum contagiosum*, localizadas en la cara, en los brazos y en la parte superior del tronco, y en muchos casos se observa una linfadenopatía generalizada y una marcada hepato-esplenomegalia (38).

En la Figura 3-10 y 3-11 se muestra la morfología de *Aspergillus fumigatus*.

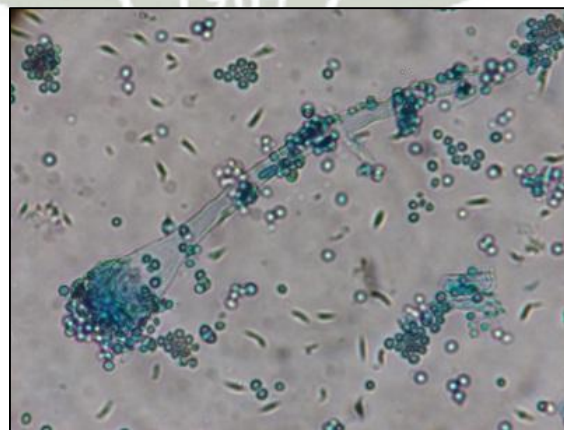
**FIGURA 3-10**

**Micelio y reverso de colonia de *Aspergillus fumigatus***

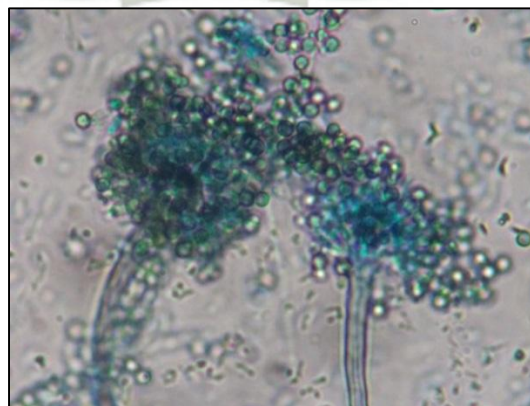


**FIGURA 3-11**

**Observación microscópica de *Aspergillus fumigatus***



*Aspergillus fumigatus* es un patógeno oportunista que causa infecciones locales y superficiales como las micosis (otomicosis, onicomicosis, queratitis) y el aspergiloma o bola fúngica que se desarrolla en una cavidad como en una lesión pulmonar, producida por una enfermedad pulmonar previa o en un seno nasal. En individuos con el sistema inmunitario debilitado produce infecciones invasivas, como la aspergilosis invasiva diseminada que cursa de forma grave con neumonía, afectando al pulmón y pudiéndose diseminar a otros órganos. La transmisión se produce principalmente por medio de las esporas o conidios, que se encuentran presentes en el ambiente en forma de bioaerosoles y penetran en el organismo por vía respiratoria. Es uno de los principales responsables de casos de enfermedad nosocomial. (39)

**FIGURA 3-12****Micelio y reverso de colonia de *Aspergillus niger*****FIGURA 3-13****Observación microscópica de *Aspergillus niger***

En la Figura 3-12 y 3-13 se observa la morfología de *Aspergillus niger*, este microorganismo no causa tantas enfermedades como otras especies de *Aspergillus*, pero en altas concentraciones puede producir aspergilosis, que provoca alteraciones pulmonares. (39)

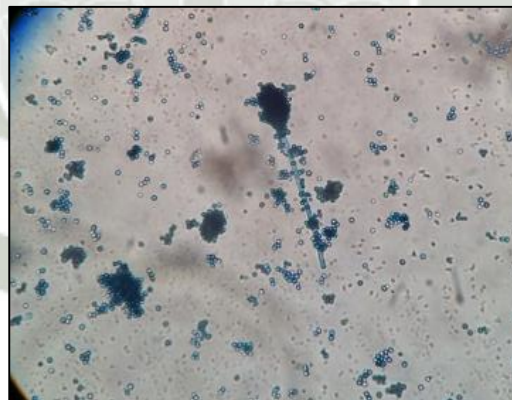
**FIGURA 3-14**

**Micelio y reverso de colonia de *Aspergillus flavus***



**FIGURA 3-15**

**Observación microscópica de *Aspergillus flavus***

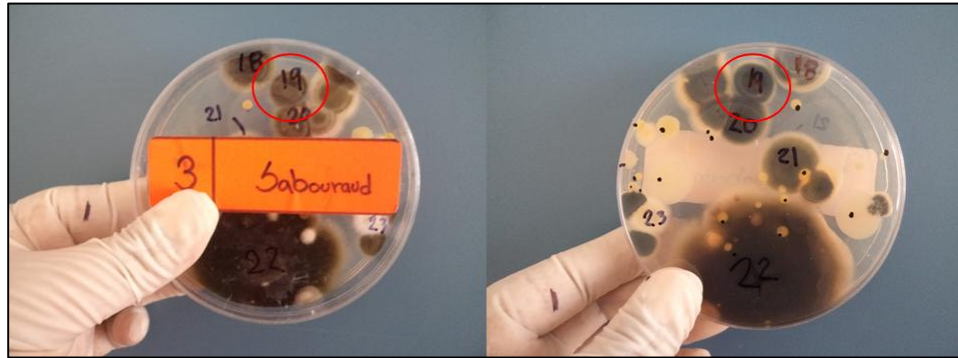


En la Figura 3-14 y 3-15 se observa la morfología de *Aspergillus flavus*, este es un hongo oportunista y también toma ventaja de personas inmunocomprometidas. Entre las patologías más frecuentes se encuentran: aspergilosis pulmonar invasiva, onicomycosis, otomicosis y sinusitis alérgica (39).

En la Figura 3-16 y 3-17 se observa la morfología de *Cladosporium*.

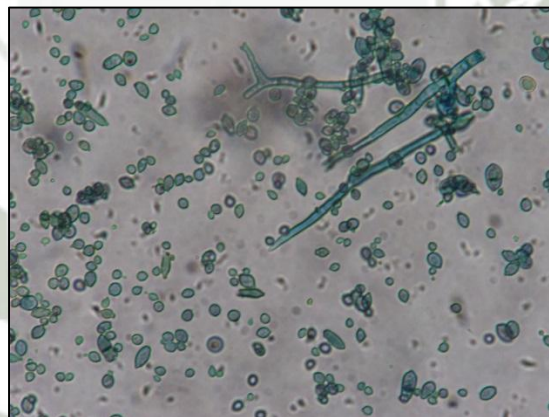
**FIGURA 3-16**

**Micelio y reverso de colonia de *Cladosporium***



**FIGURA 3-17**

**Observación microscópica de *Cladosporium***



Especies de *Cladosporium* son los hongos más comunes de aire exterior y se pueden encontrar en casi todas las partes del mundo, excepto para las regiones polares. Los tipos más comunes son *Cladosporium herbarum* y *Cladosporium cladosporioides*. Como patógeno puede causar infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, pues causa la cromoblastomycosis, que es una lesión en la piel y *Cladosporium cladosporioides* generalmente se asocia con infecciones cutáneas, oculares y nasales. La mayoría de especies se consideran alérgenos importantes, ya que

los conidios o esporas y fragmentos de hifas son capaces de provocar estados alérgicos como asma, fiebre del heno y neumonía por hipersensibilidad, de ahí que se plantea que aproximadamente 10 % de la población es sensible a este hongo (15).

**FIGURA 3-18**

**Micelio y reverso de colonia de *Fusarium***



**FIGURA 3-19**

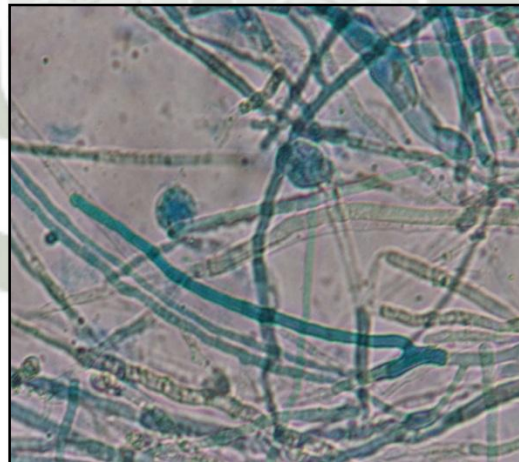
**Observación microscópica de *Fusarium***



En la Figura 3-18 y 3-19 observa la morfología de *Fusarium*.

Las dos vías de adquisición de la infección más probables son la respiratoria y la cutánea. Las conidias se inhalan y en el paciente predispuesto, causan una infección pulmonar. Por vía cutánea, el paciente puede estar colonizado y tener onicomycosis,

celulitis, infección del catéter, etc. Desde estas localizaciones el hongo se puede diseminar por vía hematógena a otros órganos. La posibilidad de entrar por el tracto gastrointestinal es rara. Se ha especulado con que las toxinas producidas por especies del género *Fusarium* pueden aumentar el daño tisular, facilitando su entrada en la circulación (39).

**FIGURA 3-20****Micelio y reverso de colonia de *Rhizopus*****FIGURA 3-21****Observación microscópica de *Rhizopus***

En la Figura 3-20 y 3-21 se observa la morfología de *Rhizopus*. Este género puede causar reacciones alérgicas e infecciones como mucormicosis que se presenta en todo el mundo y como otras muchas infecciones por hongos de bajo poder patógeno,

requiere de factores debilitantes en el hospedero. Debido a su capacidad invasiva a través de las paredes de los vasos sanguíneos, que causan infartos, necrosis y diseminación (39).

En la Figura 3-22 y 3-23 se puede observar la morfología de *Absidia*.

**FIGURA 3-22**

**Micelio y reverso de colonia de *Absidia***



**FIGURA 3-23**

**Observación microscópica de *Absidia***



Hongos del género *Absidia* pueden infectar la piel, los pulmones, el sistema nervioso y el cerebro o causar infecciones diseminadas. La especie *Absidia ramosa* (*Mucor ramosus*) es patógena para el hombre, crece en el pan y vegetales marchitos, y causa otomicosis y en ocasiones mucomicosis (39). En la Figura 3-24 y 3-25 se puede observar la morfología de *Alternaria*.

**FIGURA 3-24**

**Micelio y reverso de colonia de *Alternaria***



**FIGURA 3-25**

**Observación microscópica de *Alternaria***



*Alternaria*, es uno de los hongos más extensamente distribuidos y uno de los principales alérgenos. Puede provocar lesiones cutáneas y subcutáneas después de traumatismos en personas con inmunosupresión (39).

#### **4. CUANTIFICACIÓN DE UFC DE BACTERIAS Y HONGOS POR ÁREAS**

##### **4.1. Área 1 o de acondicionamiento**

Es el área donde se reciben las bandejas con medicamentos e insumos médicos requeridos por cada paciente, se les acondiciona para su preparación o se les almacena hasta el día de su tratamiento.

#### 4.1.1. Número de UFC halladas en el aire mediante el método de sedimentación.

La cuantificación de microorganismos en el aire es difícil de realizar y las muestras se pueden recolectar de diferentes maneras: muestreo activo, que se realiza mediante la aspiración e impacto de un volumen conocido de aire en un medio de cultivo; y el muestreo pasivo, que consiste en la exposición de placas de Petri con medios de cultivo al aire por un determinado período de tiempo. (20)

Se procedió según el método pasivo, para ello se utilizaron 8 grupos de 5 placas con diferente medio de cultivo cada una. En la Tabla 3-4 se observa la sumatoria de UFC contabilizadas (TSA, MS, Sabouraud, MC y SS) para detectar las zonas más contaminadas.

De los siete puntos de muestreo, se presume que el aire de solo uno de ellos se encuentra en completa esterilidad. A pesar de ello es importante resaltar que se debe mantener el nivel de limpieza y desinfección, esta zona corresponde al interior del refrigerador, donde las condiciones de temperatura y humedad ayudan a mantener la asepsia necesaria para la conservación de medicamentos almacenados en este lugar.

También se observa que los resultados de los seis puntos restantes exceden a los límites recomendados para contaminación microbiana de acuerdo a las BPM. Esta área está clasificada en grado A, significa que el número de UFC/placa debería ser menor a uno. En la Tabla 3-3 y en la Figura 3-26 se expresa el número de UFC en porcentaje.

**TABLA 3-2**

**Número de UFC que representan la contaminación del aire en el Área de Acondicionamiento o ÁREA 1**

Zona	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
E	13	1	12	-	-	26
F1	43	4	7	-	-	54
F2	-	-	-	-	-	0
C1	17	2	11	-	-	30
M	14	2	7	-	-	23
N	23	-	8	-	-	31
D	27	7	15	-	-	49
						<b>213</b>

**TABLA 3-3**

**Número de UFC expresado en porcentaje que representan la contaminación del aire en el Área de Acondicionamiento o ÁREA 1**

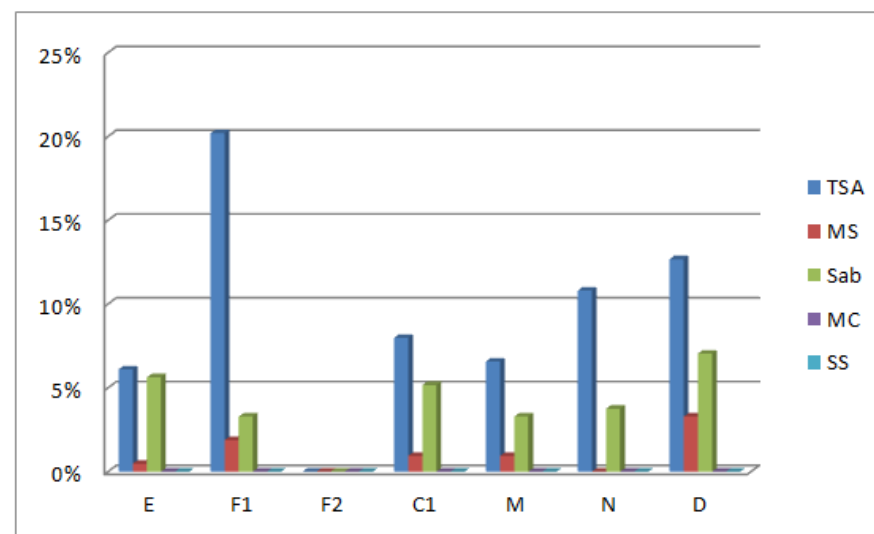
Zona	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
E	6%	0%	6%	-	-	12%
F1	20%	2%	3%	-	-	25%
F2	-	-	-	-	-	0%
C1	8%	1%	5%	-	-	14%
M	7%	1%	3%	-	-	11%
N	11%	-	4%	-	-	15%
D	13%	3%	7%	-	-	23%
						<b>100%</b>

La carga microbiana hallada en esta área se describe en orden decreciente de la siguiente manera: el 25% de los microorganismos fueron hallados en la zona F1 (parte superior del refrigerador), de los cuales, 20% corresponden a mesófilos viables, 2% a *Staphylococcus* y 3% a mohos y levaduras; 23% de los microorganismos fueron hallados en la zona D (mesón del contenedor), de los cuales 13% corresponden a

mesófilos viables, 3% a *Staphylococcus* y 7% a mohos y levaduras; 15% de los microorganismos fueron hallados en la zona N (mesón de trabajo), de los cuales 11% corresponden a mesófilos viables y 4% a mohos y levaduras; 12% de los microorganismos fueron hallados en la zona E (estante de almacenamiento), de los cuales 6% corresponden a mesófilos viables, menos del 0.5% a *Staphylococcus* y 6% a mohos y levaduras; 14% de los microorganismos fueron hallados en la zona C1 (primer nivel del coche), de los cuales 8% corresponden a mesófilos viables, 1% a *Staphylococcus* y 5% a mohos y levaduras; 11% de los microorganismos fueron hallados en la zona M (mesón de apoyo), de los cuales 7% corresponden a mesófilos viables, 1% a *Staphylococcus* y 3% a mohos y levaduras.

**FIFURA 3-26**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana del aire de las diferentes zonas del Área de Acondicionamiento o ÁREA 1**



En un estudio realizado por Caorsi P. Beatriz y colaboradores en el Hospital Clínico Universidad de Chile en el que se evaluó la calidad

microbiológica del aire de una unidad de preparados farmacéuticos estériles, también se obtuvieron valores superiores al límite (el 4% de 57% de muestras positivas). Es importante recalcar que en el estudio mencionado se llevó a cabo una monitorización (procedimiento más complejo y por tanto diferente a evaluación microbiológica) de puntos representativos de la unidad, diariamente entre enero y febrero en el año 2005 y bisemanalmente de junio a febrero en el año 2006.

#### **4.1.2. Número de UFC halladas en las superficies de trabajo, agua y manos del manipulador mediante el método de contacto utilizando Placas Petrifilm.**

La cuantificación de microorganismos puede ser realizada por diferentes métodos (hisopado, arrastre con esponja y otros), que debido a su metodología en la toma de muestra se corre el riesgo de contaminar el área destinada a análisis, para eliminar esta inquietud se utilizaron Placas Petrifilm 3M (para bacterias y hongos) que son productos de esterilidad garantizada, además su manipulación es sencilla e ideal para estudios de esta índole.

La recolección de muestras fueron obtenidas del contacto directo con superficies de las zonas E (estante de almacenamiento de bandejas), C1 (primer nivel del coche), C2 (segundo nivel del coche), M (mesa de apoyo), N (mesa de trabajo), L1 (lavatorio derecho) y L2 (lavatorio izquierdo), también se evaluaron las manos del manipulador, el interior del refrigerador, agua del caño, jabón y la base de una bandeja con medicamentos escogida al azar.

**TABLA 3-4**

**Número de UFC halladas en superficies, manos de manipulador, jabón y agua del Área de Acondicionamiento o ÁREA 1**

<b>Zona</b>	<b>Bacterias</b>	<b>Hongos</b>	<b>Total</b>
E	-	4	4
F2	-	-	-
C1	-	8	8
C2	-	3	3
M	-	-	-
N	-	2	2
L	-	-	-
Bandeja	-	1	1
Guantes 1	-	1	1
Agua	1	-	1
Jabón	-	-	-
	1	19	20

Es importante resaltar que como señala Sousa Carréra Jaqueline y colaboradores en su trabajo de investigación desarrollado en un hospital de referencia en el tratamiento de cáncer en el Estado de Pará, Brasil, en el que realizaron una evaluación microbiológica del proceso de manipulación de antineoplásicos, que la carga microbiana hallada en superficies no guarda relación directa con la carga microbiana hallada en el aire. Esto se puede confirmar revisando la Tabla 3-4, donde se observa que todas las muestras a excepción del agua, dan negativo a bacterias aunque ya se mencionó que el aire que las rodea está contaminado. Esta situación podría deberse a que el procedimiento de preparación de antineoplásicos en la UMO del IREN-Sur siempre comienza con una desinfección de las superficies de trabajo con alcohol al 70%, se puede decir que llevar a cabo este procedimiento elimina una gran cantidad de bacterias y algunas esporas de hongos, el resto de microorganismos permanece en suspensión, es por eso que al analizar

aire, los resultados son considerablemente más elevados que para superficies.

**TABLA 3-5**

**Número de UFC expresado en porcentaje que representan la contaminación de superficies de contacto, agua y jabón dentro del Área de Acondicionamiento o ÁREA 1**

Zona	Bacterias	Hongos	Total
E	-	20%	20%
F2	-	-	-
C1	-	40%	40%
C2	-	15%	15%
M	-	-	-
N	-	10%	10%
L	-	-	-
Bandeja	-	5%	5%
Guantes	-	5%	5%
Agua	5%	-	5%
Jabón	-	-	-
	5%	95%	100%

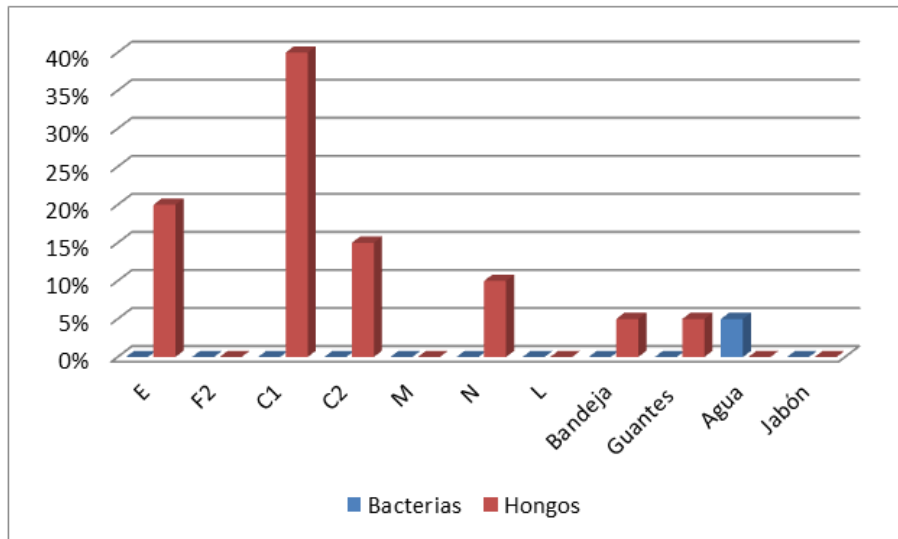
Se puede observar que las muestras correspondientes al interior del refrigerador, la base de los dos lavatorios, y la disolución de jabón, no presentaron crecimiento de bacterias ni de hongos. En cuanto al refrigerador, la baja temperatura y el bajo porcentaje de humedad favorece la poca probabilidad de crecimiento microbiano, la base de los lavatorios al momento del análisis se encontraba impregnada de alcohol debido al procedimiento rutinario de lavar cada frasco que se va a utilizar, el jabón es un agente antimicrobiano que cumple con su función.

La carga microbiana hallada en esta área se describe en orden decreciente de la siguiente manera: el 95% de los microorganismos hallados son de origen fúngico (40% en la zona C1, 20% en la zona E,

15% en la zona C2, 10% en la zona N, 5% en la bandeja, 5% en los guantes) y solo el 5% corresponde a una colonia bacteriana hallada en el agua (Figura 3-27).

**FIGURA 3-27**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana de superficies, guantes, agua y jabón por zonas del Área de Acondicionamiento o ÁREA 1**



**FIGURA 3-28**

**Crecimiento bacterial de la muestra de agua**



Para que el análisis de agua sea representativo, se siguieron normas para la toma de muestras de agua potable. No se encontraron antecedentes de evaluación microbiológica específicos a agua dentro de este tipo de área, pero estudios como el realizado por Mireya del Pilar Arcos Pulido y colaboradores, que realizaron una evaluación de los indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua, informan que conocer la calidad microbiológica del agua es de suma importancia debido al riesgo asociado con la ingesta de agua contaminada con microorganismos que podrían ser patógenas.

#### 4.2. Área 2 o de preparación

Es el área donde se prepara y reconstituyen los antineoplásicos, es el área donde se encuentra la cabina de seguridad biológica. Según los límites recomendados por las BPM está catalogada en grado A, significa que la contaminación bacteriana debe ser menor a 1 UFC.

##### 4.2.1. Número de UFC halladas en el aire mediante el método de sedimentación.

En la Tabla 3-6 se observa la sumatoria de UFC contabilizadas en agares de TSA, MC, SS, MS y Sabouraud.

**TABLA 3-6**

**Número de UFC que representan la contaminación del aire en el Área de Preparación**

Área	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
CB	9	-	-	-	-	9
C1	40	-	8	-	-	48
C2	33	-	6	-	-	39
						96

Los resultados obtenidos claramente exceden a los límites recomendados permisibles ya que para esta área deben de ser menores a uno. Este resultado es alarmante pero es importante mencionar que en los antecedentes como el estudio realizado por Sousa Carréra Jaqueline y colaboradores en un hospital de referencia en el tratamiento de cáncer en el Estado de Pará, Brasil también se encontró una elevada cantidad de microorganismos, en el que un total de 31 UFC fueron aisladas de las fuentes analizadas y 22 (71%) se obtuvieron de la CSB.

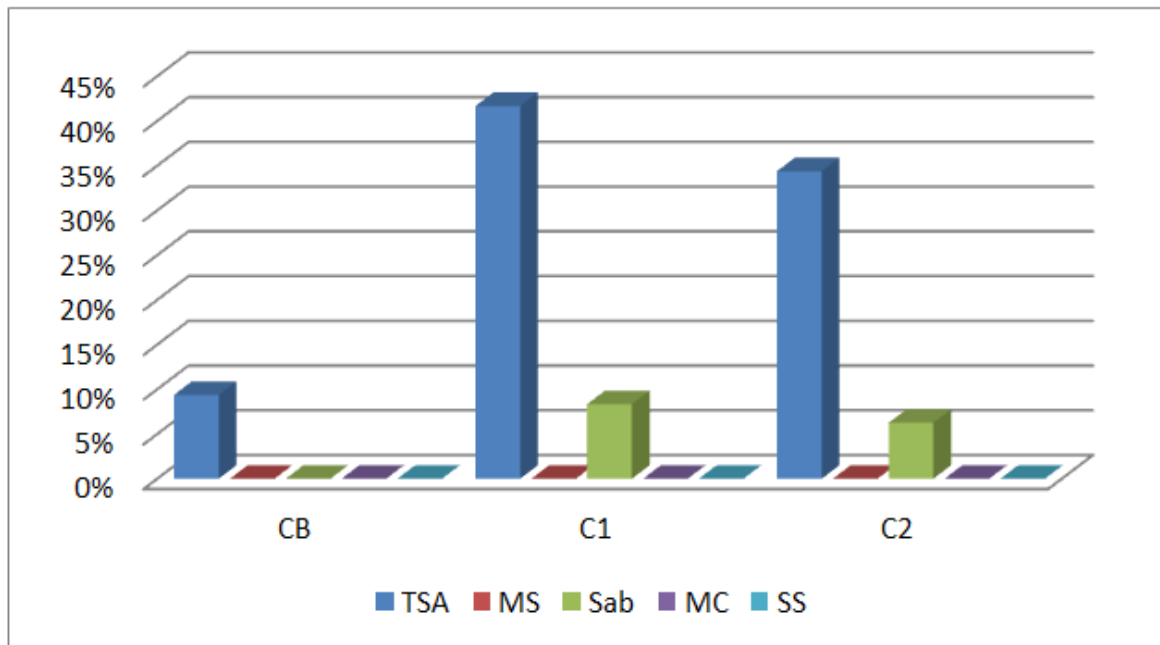
**TABLA 3-7**  
**Número de UFC expresado en porcentaje que representan la contaminación del aire en el Área de Preparación o ÁREA 2**

Área	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
CB	9%	-	-	-	-	9%
C1	42%	-	8%	-	-	50%
C2	34%	-	6%	-	-	41%
						100%

En la Tabla 3-7 se describe el resultado en porcentaje, la carga microbiana es de la siguiente manera: el 9% de los microorganismos fueron hallados en la cabina de seguridad biológica (zona CB) que corresponden en su totalidad a mesófilos viables; 50 % de los microorganismos fueron hallados en la zona C1 (primer piso del coche), de los cuales 42% corresponden a mesófilos viables y 8% a mohos y levaduras; 41% de los microorganismos fueron hallados en la zona C2 (segundo piso del coche), de los cuales 34% corresponden a mesófilos viables y 6% a mohos y levaduras.

**FIGURA 3-29**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana del aire de las diferentes zonas del Área de Preparación o ÁREA 2**



**4.2.2. Número de UFC halladas en las superficies de trabajo y manos del manipulador mediante el método de contacto utilizando Placas Petrifilm.**

En la Tabla 3-8 se observan los resultados de la cuantificación de UFC que crecieron en Placas Petrifilm para bacterias y Placas Petrifilm de crecimiento rápido para mohos y levaduras que fueron sometidas a contacto directo con superficies que están dentro de la cabina de seguridad biológica (CSB), los dos pisos del coche y superficies del transfer de paso que comunica el Área 2 con el Área 1.

No se observó crecimiento en los guantes del manipulador que utilizaba la CSB. En la Tabla 3-9 y la Figura 3-30 se expresan estos resultados en porcentaje.

TABLA 3-8

**Número de UFC que representan la contaminación de superficies de contacto, agua y jabón dentro del Área de Preparación o ÁREA 2**

<b>Zona</b>	<b>Bacterias</b>	<b>Hongos</b>
CB Lder	-	1
CB Lizq	-	-
CB Fren	-	2
CB Tech	-	-
CB Puert	-	1
CB Piso	-	-
C1	-	18
C2	-	1
T Lder	-	-
T Lizq	-	-
T Fren	-	1
T Tech	-	-
T Puert	-	-
T Piso	-	-
Guantes 2	-	-
	0	24

En esta área tampoco se observa crecimiento bacterial y el crecimiento de hongos es bajo en comparación a los resultados hallados en el aire, las razones de ya fueron explicadas con detalle en la discusión del primer área.

La carga microbiana hallada en esta área se describe de la siguiente manera: 75% en el primer nivel del coche, 4% en el segundo; en el interior de la CSB se encontró 8% en el lado frontal, 4 % en el lado derecho y 5% en la puerta y por último en la zona frontal del transfer también se encontró un 4%.

**TABLA 3-9**

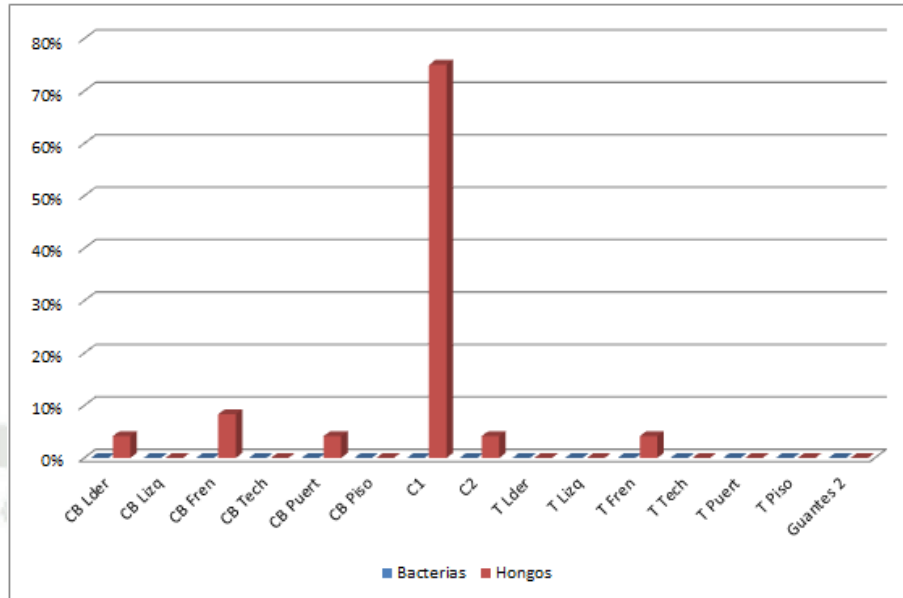
**Número de UFC expresado en porcentaje que representan la contaminación de superficies de contacto y guantes del Área de Preparación o ÁREA 2**

<b>Zona</b>	<b>Bacterias</b>	<b>Hongos</b>
CB Lder	-	4%
CB Lizq	-	-
CB Fren	-	8%
CB Tech	-	-
CB Puert	-	4%
CB Piso	-	-
C1	-	75%
C2	-	4%
T Lder	-	-
T Lizq	-	-
T Fren	-	4%
T Tech	-	-
T Puert	-	-
T Piso	-	-
Guantes 2	-	-
	0%	100%

El elevado porcentaje hallado en el primer nivel del coche puede deberse a que es una superficie con la que generalmente no se tiene mucho contacto, además, al momento de la desinfección es probable que no se le dé el mismo nivel de atención que a la superficie del segundo nivel.

**FIGURA 3-30**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana de superficies y guantes del Área de Preparación o ÁREA 2**



#### 4.3. Área 3 o área de paso.

Es una zona de paso entre el área de vestuario y la sala de acondicionamiento. Debido a que no existe ninguna superficie de trabajo, esta área solo fue sometida a evaluación de aire por método de sedimentación. La categoría de esta área es grado B según los límites recomendados para contaminación microbiana por las BPM, esto significa que el resultado no debe exceder a 5 UFC.

**TABLA 3-10**

**Número de UFC que representan la contaminación del aire del Área de Paso o ÁREA 3**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
Única	33	-	19	-	-	52

En la Tabla 3-10 se observa resultados negativos para medios MS, MC, y SS, en tanto, el crecimiento de microorganismos es moderado para medios TSA y

Sabouraud, 33 y 19 UFC respectivamente, estos valores exceden a los límites permisibles. Es importante tomar en consideración que esta área no contaba con ninguna mesa o soporte en el que se pudieran colocar las placas de Petri, por tanto fueron colocadas al nivel del suelo sobre una lámina de papel estéril.

En la Tabla 3-11 se observa los resultados en porcentaje, se halló un total de 52 UFC, de las cuales 64% representan el crecimiento de microorganismos mesófilos viables y el 36% representan el crecimiento de hongos y levaduras. En la Figura 3-31 se observa el mismo resultado de forma gráfica.

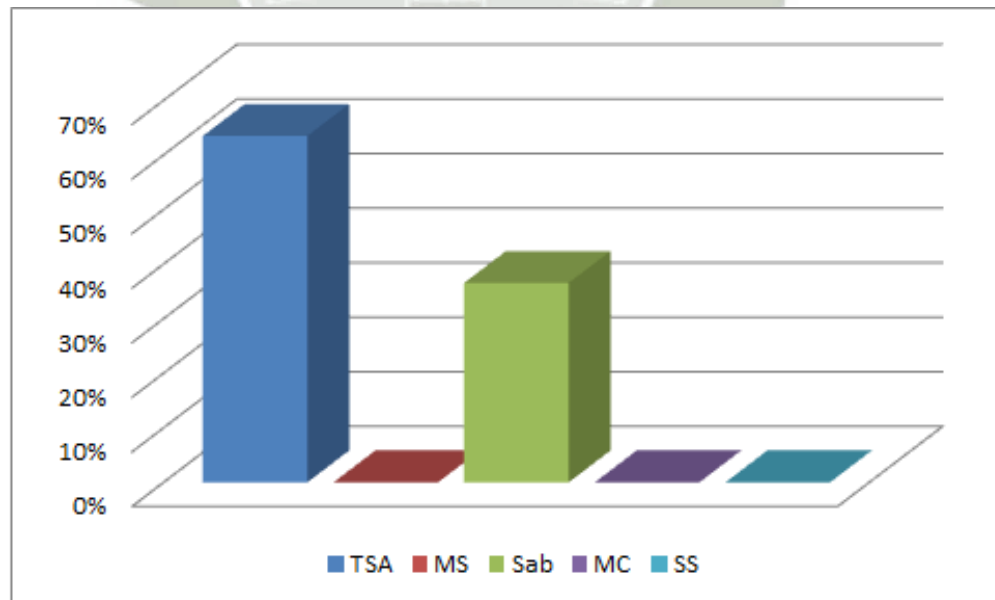
**TABLA 3-11**

**Número de UFC expresado en porcentaje que representan la contaminación del aire del Área de Paso o ÁREA 3**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS
Única	63%	-	37%	-	-

**FIGURA 3-31**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana del aire del Área de paso o ÁREA 3**



#### 4.4. Área 4 o cuarto de baño

Es un área al que no se le atribuye una categoría en grado de esterilidad, pero se encuentra en contacto directo con el área de vestuario que tiene una categoría en grado C, entonces, solo por fines de evaluación de este proyecto se considera esta área como grado D. Su estudio del aire fue realizado por el método de sedimentación.

**TABLA 3-12**

**Número de UFC que representan la contaminación del aire del Baño o ÁREA 4**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
Única	257	47	124	1	6	435

En la Tabla 3-12 se muestra la cantidad de UFC que fueron halladas en los cinco diferentes medios de estudio. El límite recomendado para contaminación microbiana de esta área es hasta 100 UFC. Este valor se ve claramente excedido.

**TABLA 3-13**

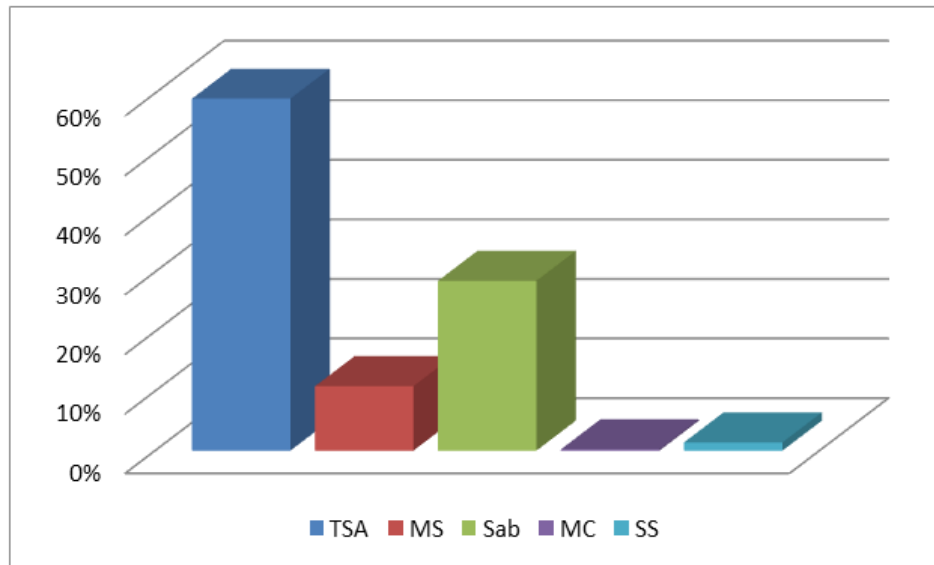
**Número de UFC expresado en porcentaje que representan la contaminación del aire del Baño o ÁREA 4**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS
Única	59%	11%	29%	0%	1%

En la tabla 3-13 se observa el resultado expresado en porcentaje, el 59% de los microorganismos corresponden a mesófilos viables; 28% corresponden a mohos y levaduras; 11% corresponden a *Staphylococcus*, el 1% a coliformes y el 0.2% a enterobacterias. (Ver Figura 3-32)

**FIGURA 3-32**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana del aire del Baño o Área 4**



**4.5. Área 5 o de vestuario**

Es donde se encuentran los casilleros y es el primer área con el que los manipuladores tienen contacto al ingresar a la UMO. Según los límites recomendados para contaminación microbiana, esta área está categorizada en grado C, significa que se acepta el crecimiento de hasta 25 UFC.

**TABLA 3-14**

**Número de UFC que representan la contaminación del aire del Vestuario o ÁREA 5**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
Única	62	35	52	-	-	115

En la Tabla 3-14 se puede observar el número de microorganismos hallados, los cuales exceden los límites establecidos por las BPM.

En la Tabla 3-15 se observan los resultados en porcentaje, se puede ver que el 54% de los microorganismos corresponden a mesófilos viables; 45% corresponden a mohos y levaduras; 30% corresponden a Staphylococcus, y no se evidenció crecimiento en los medios MC y SS. (Ver Figura 3-33)

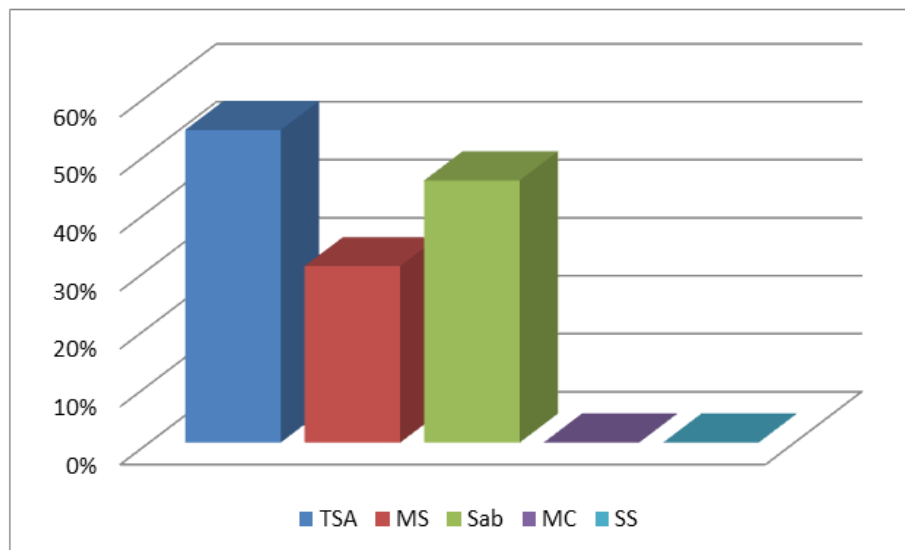
**TABLA 3-15**

**Número de UFC que representan la contaminación del aire del Vestuario o ÁREA 5**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS
Única	54%	30%	45%	-	-

**FIGURA 3-33**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana del aire del Vestuario o ÁREA 5**



#### 4.6. Área 6 o de almacenamiento

Es un área donde se almacenan implementos de vestuario, material de escritorio y archivos, además presenta poca rotación de personas. Esta área, al igual que el cuarto de baño, tampoco se le atribuye una categoría en grado de esterilidad, pero,

también se encuentra en contacto directo con el área de vestuario que tiene una categoría en grado C, entonces, solo por fines de evaluación de este proyecto se considera esta área como grado D. El límite recomendado para contaminación microbiana es de 100 UFC.

**TABLA 3-16**

**Número de UFC que representan la contaminación del aire del Área de Almacenamiento  
o ÁREA 6**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
Única	40	6	6	-	-	52

En la Tabla 3-16 se puede observar el número de microorganismos hallados, los resultados no se exceden los límites recomendados por las BPM. Es importante resaltar que este es un área que no presenta mucho movimiento de personas y es probable que la mayoría de microorganismos no se encuentren en suspensión.

**TABLA 3-17**

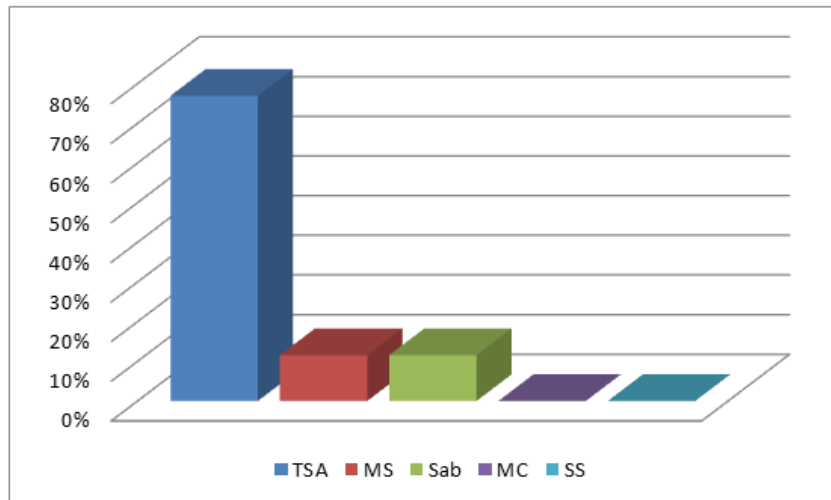
**Número de UFC que representan la contaminación del aire del Área de Almacenamiento  
o ÁREA 6**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS
Única	77%	12%	12%	0%	0%

En la Tabla 3-17 y en la Figura 3-34 se observan los resultados en porcentaje, el 76% de los microorganismos corresponden a mesófilos viables; 12% corresponden a mohos y levaduras; 12% también corresponden a Staphylococcus, y no se evidenció crecimiento en los medios MC y SS.

**FIGURA 3-34**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana del aire del Área de Almacenamiento o ÁREA 6**



**4.7. Área 7 o sala de recepción de quimioterapia.**

Es la sala donde los pacientes reciben quimioterapia y hay un alto movimiento de personas (personal asistencial, familiares y pacientes). Esta área no está categorizada en ningún grado dentro de los límites recomendados por las BPM, es así que su análisis es referencial debido a que está en contacto con el área 1 a través de los transferes de entrada y de salida.

**4.7.1. Número de UFC halladas en el aire mediante el método de sedimentación.**

En la Tabla 3-18 se observa la sumatoria de UFC contabilizadas en agares de TSA, MC, SS, MS y Sabouraud. Los resultados se expresan por separado ya que se trata de dos zonas diferenciadas. En la tabla 3-19 se observan los resultados expresados en porcentaje, en el interior del transfer de entrada (23% corresponde a mesófilos viables, 77 % a

hongos, no se halló crecimiento en los otros medios) y en la zona cercana a la UMO dentro del área de recepción de quimioterapia (67% corresponde a mesófilos viables, 26% a hongos, 8% a Staphylococcus, no se halló crecimiento en los otros medios). Las Figuras 3-35 y 3-36 muestran los resultados de forma gráfica.

**TABLA 3-18**

**Número de UFC que representan la contaminación del aire en el Área de Recepción de Quimioterapia o ÁREA 7**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
TE-Piso	3	-	10	-	-	13
QT	80	9	31	-	-	120

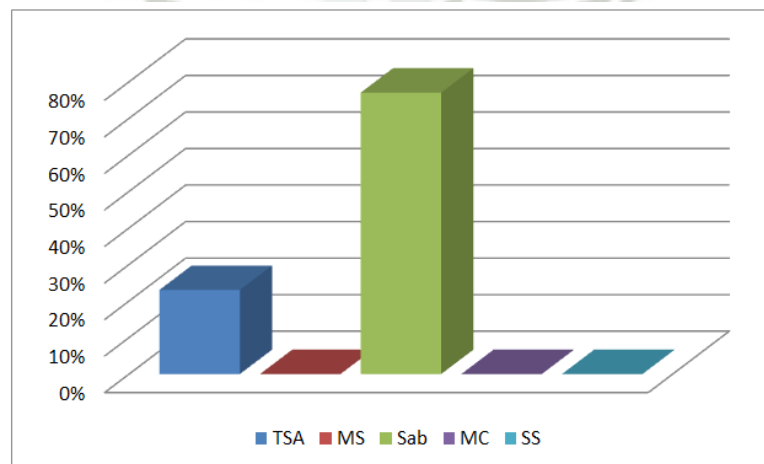
**TABLA 3-19**

**Número de UFC expresado en porcentaje que representan la contaminación del aire en el Área de Recepción de Quimioterapia o ÁREA 7**

ZONA	TSA	MS	Sab	MC	SS	Total
TE-Piso	23%	-	77%	-	-	100%
QT	67%	8%	26%	-	-	100%

**FIGURA 3-35**

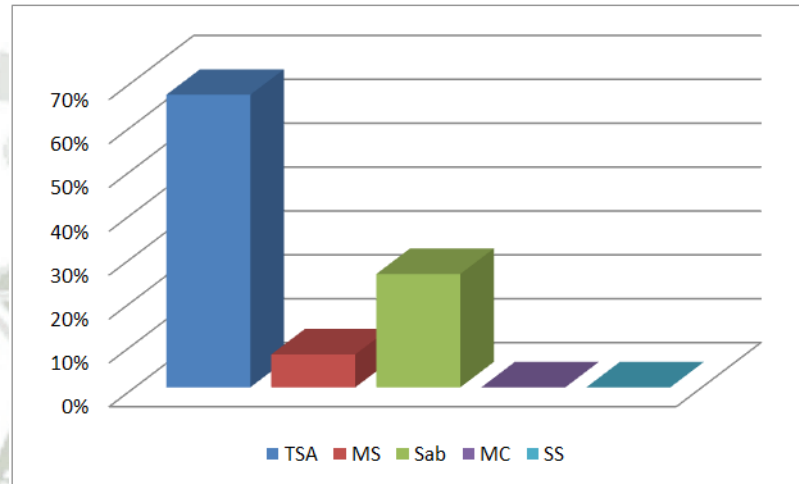
**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana del aire en el interior del Transfer de Entrada.**



Se puede presumir que el transfer de entrada es una posible vía contaminación.

**FIGURA 3-36**

**Diferenciación en porcentaje de la contaminación microbiana del aire de la zona cercana al Transfer de Entrada en la Sala de Quimioterapia**



**4.7.2. Número de UFC halladas en las superficies de los transferes de entrada y de salida mediante el método de contacto utilizando Placas Petrifilm.**

En la Tabla 3-20 y 3-21 se observan los resultados de la cuantificación de UFC que crecieron en Placas Petrifilm para bacterias y hongos sometidas a contacto directo con superficies dentro del transfer de entrada y de salida.

Se puede ver la ausencia de crecimiento bacterial.

A pesar de que el proceso de limpieza para ambos transferes sea similar, los resultados en número de UFC son diferentes, esto confirmaría lo que se presume con los resultados del análisis del aire

realizado solamente en el transfer de entrada. No se realizó un análisis de aire en el transfer de salida debido a que se estaba utilizando en el momento de la evaluación.

**TABLA 3-20**

**Número de UFC halladas en las superficies del interior del transfer de entrada.**

Zona	Bacterias	Hongos
TE Lder	-	-
TE Lizq	-	-
TE Fren	-	-
TE Tech	-	-
TE Puert	-	1
TE Piso	-	17
		18

**TABLA 3-21**

**Número de UFC halladas en las superficies del interior del transfer de salida.**

Zona	Bacterias	Hongos
TS Lder	-	-
TS Lizq	-	-
TS Fren	-	-
TS Tech	-	-
TS Puert	-	-
TS Piso	-	7
		7

Los resultados hallados, se corrobora lo expuesto en otros estudios que describen la frecuencia de contaminación microbiológica en ambientes hospitalarios supuestamente limpios, pues son de mucha importancia para la prevención de infecciones.

Los géneros de microorganismos hallados por Jackeline Sousa Carrera y colaboradores en un hospital de referencia en el tratamiento del cáncer en el Estado de Pará, Brasil y los hallados por Bedregal Durand Flor y Morani Suella Sharai, en el hospital nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo Essalud en Arequipa, son similares a los encontrados en la UMO del IREN-Sur (21, 22).

Las cantidades de UFC no son comparables, ya que las metodologías de recolección e identificación no fueron aplicadas de la misma forma que en este trabajo, pero, su presencia se debe a que estos microorganismos son considerados como contaminantes ambientales normales que se comportan como patógenos oportunistas, y causan enfermedades en individuos inmunodeprimidos.



## CONCLUSIONES

1. Se evaluó el número de UFC de bacterias y hongos hallados en el aire, superficies y agua del área de acondicionamiento (grado A) y se demostró que los resultados sobrepasan los límites establecidos por las BPM que recomiendan la existencia de menos de 1 UFC.
2. Se evaluó el número de UFC de bacterias y hongos hallados en el aire y superficies del área de preparación (grado A) y se demostró que los resultados sobrepasan los límites establecidos por las BPM que recomiendan presencia de menos de 1 UFC.
3. Se evaluó el número de UFC de bacterias y hongos del aire del área de paso (B), área de vestuario (C), cuarto de baño (D) y se demostró que los resultados exceden a los límites recomendados por las BPM, solamente el área de almacenamiento (D) presenta resultados que se encuentran dentro de estos límites permisibles.
4. Se evaluó el número de UFC de bacterias y hongos del aire de la única zona del área 7 (sala de recepción de quimioterapia) y del interior del transfer de entrada, pudiéndose detectar que la contaminación microbiana presente es elevada y desfavorablemente podría ingresar a la UMO, principalmente en bandejas de medicamentos. Se evaluó también las superficies del interior de los transferes de entrada y de salida donde se puede observar una clara diferencia en su calidad microbiana.
5. Se determinó en función a los resultados anteriores, que las condiciones de calidad establecidas en el manual de las BPM no se estarían cumpliendo, no obstante, es importante mencionar que esta guía basa su aplicación principalmente en el ámbito industrial donde las instalaciones y las condiciones laborales facilitan su cumplimiento.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar una revisión de los procedimientos de limpieza actuales de la UMO del IREN-Sur y que se valide un protocolo que se ajuste a las necesidades de cada área para poder lograr la disminución de microorganismos presentes y evitar el posible ingreso de nuevos contaminantes, además se recomienda desplegar un proceso de monitoreo ambiental que garantice la reducción y/o mitigación progresiva de organismos microbianos y así, poder garantizar la asepsia de la preparación.
2. Se recomienda también realizar estudios para evaluar el producto final y poder determinar su calidad.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Chabner Bruce A., Lynch Thomas J., Longo Dan L. Harrison Manual de Oncología (McGraw-Hill).
2. Cajaraville, G., & Tamés, M., Guía de Manejo de Medicamentos Citostáticos (<http://www.sefh.es/bibliotecavirtual/citostaticos/guiamanejocitos.pdf>).
3. Delgado, M. Escamilla, L. Pérez, A. Arias, J. Determinación de parámetros de la contaminación microbiana presente en un área de fabricación de medicamentos estériles a base de antibióticos betalactámicos. Grupo de Biotecnología e Industrial Ambiental. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
4. Beatriz Caorsi P., Andrea Sakurada Z., M. Teresa Ulloa F, Marcela Pezzani V. y Paz Latorre O. Calidad microbiológica del aire de una unidad de preparados farmacéuticos estériles. Chile 2009.
5. Pharmaceutical inspection convention. Pharmaceutical inspection co-operation scheme: guide to good manufacturing practice for medicinal products. Geneva: PIC/S; 2004. 143 p.
6. Restrepo M. Angela, Robledo R. Jaime, Leiderman W. Eduardo, Restrepo I. Marcos, Botero R. David, Bedoya E. Victoria. Fundamentos de medicina: Enfermedades infecciosas. 7ma ed. Medellín 2010.
7. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfäuer, Microbiología médica.
8. Schlegel Hans G. Microbiología general (Omega).
9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Diagnóstico microbiológico. 6. ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2008. 1468 p.
10. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología médica 25a edición (McGraw-Hill).
11. Microbiology de Prescott, Harley y Klein 7ma edición (McGraw-Hill).
12. Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker. Brock's Biology of Microorganisms 8th Packag Edition.
13. Jave Marquez Mercedes. Guía de Prácticas de microbiología. 2da parte. 2010
14. Kenneth J. Ryan, C. George Ray. Microbiología médica 5ta edición (McGraw-Hill).

15. Borrego Alonso Sofía. Cladosporium: género fúngico que deteriora soportes documentales y afecta a la salud del hombre. 2012.
16. Manual de Medios de Cultivo (Merck).
17. Galvez P., Ruiz M.A., Soria B. y Clares B. Monitorización de partículas de una sala blanca: Requerimientos normativos en terapias avanzadas.
18. Luna Jarrín Ligia. Evaluación microbiológica del ambiente y diseño de un plan de monitoreo en la planta de lácteos. Honduras 2002.
19. Hernández López A. María, Marín Ramírez A. Felipe. Elaboración de un protocolo de muestreo que permita evaluar la calidad microbiológica del aire para el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la universidad tecnológica de pereira. Pereira 2013.
20. Alonso Nore Lina, Proveda Sanchez Jeimy. Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm 3M para el análisis de alimentos. Bogotá 2008.
21. Sousa Carréra Jaqueline, Batista do Nascimento Daisy Esther, Da Silva Mascarenhas Celso, Vasconcelos de Mendonça Lúcia Carla, Chagas Monteiro Marta, Ferraz Maia Cristiane do Socorro. Evaluación microbiológica del proceso de manipulación de antineoplásicos en un hospital de referencia en el tratamiento de cáncer en el Estado de Pará, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude [online]. 2010, vol.1, n.4, pp. 65-70. ISSN 2176-6223.
22. Bedregal Durand Flor, Morani Suclla Sharai. Control de la contaminación microbiológica en la unidad de mezclas oncológicas (UMO) y la unidad de soporte nutricional artificial (USNA) del hospital nacional Carlos Alberto Seguí Escobedo Essalud. Arequipa – 2008.
23. Camacho Carranza Rafael, Espitia Pinzón Clara, Mancilla Jiménez Raúl, Segura Salinas Erika, Castellanos Barba Carlos. Manual de Procedimientos de Bioseguridad. Universidad Nacional Autónoma de México.
24. Heidy Pérez, Vicente L. Sánchez. Propuesta de diseño de monitoreo ambiental microbiológico para diagnóstico de niveles de contaminación de áreas de procesamiento aséptico. La Habana, Cuba.

25. Cristina Eugenia Cabrera, M.Sc, Rommel Fabián Gómez, B.Sc, Andrés Edmundo Zúñiga, B.Sc. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. 2007.
26. Forbes, B A., Sahm, D F. (2009) Bailey & Scott's Diagnostico Microbiológico (12ª Ed.). Madrid, España: Panamericana.
27. Jiménez Torres N. Víctor, Albert Marí Asunción, Almenar Cubells Daniel, Vandebroucke Johan. La Seguridad del Paciente Oncológico. Estándares Internacionales para el Manejo de Citotóxicos
28. Mireya del Pilar Arcos Pulido, Sara Lilia Ávila de Navia, Msc, Sandra Mónica Estupiñán Torres MSc, Aura Cristina Gómez Prieto. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua, 2005.
29. Valenzuela Bravo M. Teresa. Evaluación de Cabinas de Seguridad Biológicas utilizadas en Áreas Biolímpias para el manejo de Agentes Antineoplásicos. Chile.
30. García, J. A., Picazo, J.J. (2001) Microbiología Medica (2a Ed.). Madrid, España: Brace.
31. Gadea Ignacio, Cuenca-Estrella Manuel, Martín Estrella, Pemán Javier, Pontón José, Rodríguez-Tudela Juan Luis. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos
32. Pahissa, A., (2009) Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* (1ª Ed.). Barcelona, España: Marge medica books.
33. Okino Sawada, Cristina Nicolussi, Okino Liyoko, Coelho Cardozo, Tontao Zago. Evaluación de la Calidad de Vida de Pacientes con Cáncer sometidos a quimioterapia. (Brasil 2008).
34. Romero, L. (2007) Microbiología y Parasitología Humana: Bases Etiológicas de Las Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (3ª Ed.). México: Panamericana-UNAM.
35. Irvin T. Hyperbaric oxygen in the treatment of infections by aerobic microorganisms. Lancet 1966;1(7434):392-4.
36. Torres Patricia, Hernán Cruz Camilo, Janeth Patiño Paola. Índices de Calidad de Agua en Fuentes Superficiales Utilizadas en la Producción de Agua para Consumo Humano Rev. ing. univ. Medellín vol.8 no.15 suppl.1 Medellín July 2009

37. Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007) Introducción a la Microbiología (9ª Ed.). EE.UU.: Editorial Médica Panamericana.
38. Serrat Concha, Magraner Josefina, Remedios Guna , Domínguez Victoria , Guerrero Álvaro, Borrás Rafael. *Penicillium marneffeii* y peniciliosis. Departamento De Microbiología, Facultad De Medicina y Hospital Clínico Universitario, Valencia.
39. M. Robles García, T. Dierssen Sotos, F.J., Llorca Díaz, P. Rodríguez Cundín, M.P. Roiz Mesones. Prevención de la infección nosocomial de origen fúngico: verificación de la bioseguridad ambiental en quirófanos.
40. Moreno Rojas Samuel, Zambrano Rodríguez Héctor, Martínez Lopera José F., González Cuéllar María P., Henríquez Iguarán Daibeth. Manual para la toma de muestras para análisis microbiológico. (Bogotá, 2008)
41. Rosa C, Sánchez C, Ullan C, Mosso A. Microbiota fungica del ambiente de una zona limpia de envasado de materias primas farmacéuticas. *Revista Científica Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid*. Nil, Nov 2002. p. 38-42.
42. Pelroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis and treatment. *Med Mycol*. 2007; 45:321-246.
43. Nodarse Hernández Rafael, Lemes Ulloa Vivian, Mena López Lázaro. Estudio microbiológico de la contaminación ambiental en una cámara hiperbárica multiplaza (2001).
44. Murray P, Barón E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. In *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edition, ASM press WD CW. 2003.
45. Beaney M Alison. *Quality Assurance of Aseptic Preparation Services*. Third Edition 2001. Londres, Pharmaceutical Press, 2001, págs 1-89.
46. Borrego Sofía, Pons Vanessa, Perdomo Ivette. La contaminación microbiana del aire en dos depósitos
47. del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 39, No. 1, 2008.
48. Velazco Elsa, Nieves Beatriz, Araque María, Calderas Zoila. Epidemiología de infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* en una unidad de alto riesgo neonatal. Volume 20, Issue 7, 2002, Pages 321–325.

49. De La Rosa M del C, Ullán C, Prieto M del P, Mosso M de los A. Calidad microbiológica del aire de una zona limpia en una industria farmacéutica. *Anal Real Acad Farm* 2000; 66:213-28.
50. T. Lisboa, b, J. Rello. Prevention of nosocomial infections: strategies to improve the safety of the patients in the intensive care unit. *Medicina Intensiva*, Volume 32, Issue 5, June 2008, Pages 248–252.
51. Beatriz Caorsi P., Andrea Sakurada Z., M. Teresa Ulloa F., Marcela Pezzani V. y Paz Latorre O. Bacteriological quality of air in a ward for sterile pharmaceutical preparations. *Rev. chil. infectol.* v.28 n.1 Santiago feb. 2011.





*“Año de la Diversificación Productiva y del Fortalecimiento de la  
Educación”.*

SOLICITO: PERMISO PARA INGRESO A LA UNIDAD DE MEZCLAS ONCOLÓGICAS

DR. WILLY YANQUI FARFAN.  
GERENTE DEL IREN SUR

Yo, FIORELLA YAJHAIRA GIL  
CAL SIN Con DNI N° 46811549,  
Bachiller en Farmacia y Bioquímica,  
ante usted con el debido respeto me  
presento y digo:

Que siendo necesario para el desarrollo de mi tesis con título **“EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA AMBIENTAL DURANTE EL PROCESO DE MANIPULACIÓN DE ANTINEOPLÁSICOS EN LA UNIDAD DE MEZCLAS ONCOLÓGICAS DEL INSTITUTO REGIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS DEL SUR. AREQUIPA – 2015”**, solicito a usted me conceda el permiso para acceder a la Unidad de Mezclas Oncológicas para llevar a cabo dicha investigación. El ingreso para la toma de muestra será una vez por semana durante un mes.

Así mismo debo señalar que mi persona realizó prácticas pre-profesionales en el IREN SUR en el año 2013, lo cual motivó mi interés en realizar una investigación en esta área. Para ello contaré con la asesoría de los Químicos Farmacéuticos Lourdes Cornejo Núñez y Guillermo Zegarra Aguilar.

En espera de su atenta respuesta, y sin otro cometido, me despido.

Arequipa, 21 de Abril del 2015



  
FIORELLA YAJHAIRA GIL CAL SIN  
DNI N° 46811549