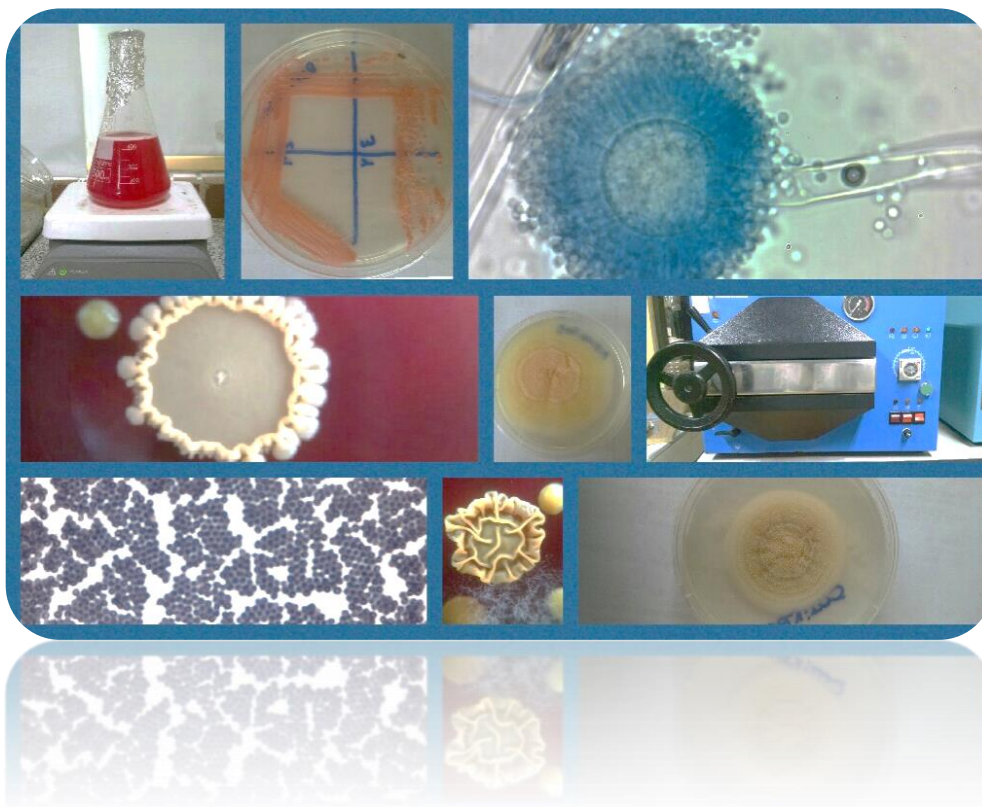




PROTOCOLO DE MONITOREO Y ANÁLISIS DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AIRE EN CENTROS DE ATENCIÓN MÉDICA

*PROTOCOLO DE MONITOREO Y ANALISIS DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AIRE EN CENTROS DE
ATENCIÓN MEDICA*

Lina	María	Guzmán	Fierro
Estudiante		de	ingeniería
Ambiental			

José	Alejandro	Pachón	Bernal
Estudiante		de	ingeniería
Ambiental			



UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD INGENIERIA AMBIENTAL
LINEA DE SALUD AMBIENTAL
2016

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. DEFINICIONES Y ACRÓNIMOS.....	5
3. GENERALIDADES.....	7
3.1. Quienes deben aplicar el protocolo	7
3.2. Propósito.....	7
4. TIPOS DE MONITOREO	7
4.1. Impactación directa en medios de cultivo.....	7
4.2. Succión.....	7
5. DESARROLLO	8
5.1. Características del lugar.....	8
5.2. Materiales, insumos y equipos	8
5.3. Cálculo puntos de muestreo	9
5.4. Cálculo número de muestras.....	10
5.5. Monitoreo	10
5.6. Seguimiento.....	12
5.7. Cuantificación de colonias	13
5.8. Caracterización	13
5.9. Descarte de material.....	15
5.10. Procesamiento Datos.....	15
BIBLIOGRAFÍA.....	18
ANEXOS	20
ANEXO I: PREPARACIÓN MEDIOS DE CULTIVO.	20
ANEXO II: FORMATO DE CAMPO	21
ANEXO III: TABLA DE FELLER.....	22
ANEXO IV: AISLAMIENTO DE COLONIAS.....	23
ANEXO V: TINCIÓN	25

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación intramural del aire y sus efectos en las transmisión de infecciones nosocomiales o intrahospitalarias (IIH), constituye un problema de salud ambiental, rama de la salud pública, dada su frecuencia, severidad, alto costo y que aportan un número importante de casos de morbilidad cada año.

Por otro lado, factores como el flujo de pacientes, la diversidad de servicios, y la posible deficiencia en el sistema de aireación, hacen que la probabilidad de adquisición de IIH sea alta, ya que aumenta la presencia de bacterias, virus y hongos patógenos que en gran proporción se encuentran asociados a bioaerosoles, por lo que cualquier paciente que se localice en el centro hospitalario, especialmente los que se encuentran en estado inmunocomprometido, pueden tener un riesgo más alto de contraer infecciones nosocomiales al estar expuesto a algún tipo de bioaerosol.

2. DEFINICIONES Y ACRÓNIMOS

Abrasivo: Un abrasivo es todo aquel material o producto químico cuya dureza es mayor que la del objeto que va a pulir, desgastar o alisar [1].

Asepsia: Se habla de asepsia para referirse al conjunto de técnicas que garantizan la ausencia de gérmenes o microorganismos infecciosos [2].

Aerosolización: Proceso de dispersión de las partículas constitutivas del bioaerosol [3].

Amplificación: Aumento en número o en concentración de los organismos, sus partes o componentes [3].

Bacteria Gram negativa: Bacterias con una capa de peptidoglican delgada y con membrana externa, al realizar la tinción de Gram pierden el color violeta con el agente decolorante y toman un color rojo al teñirse con safranina [4].

Bacteria Gram positiva: Bacterias que poseen una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana externa, al someterlas a tinción de Gram retienen el cristal violeta y por lo tanto se ven de un color violeta intenso [4].

Bioaerosol: Partículas transportadas por el aire, constituidas por seres vivos, o moléculas grandes que han sido liberadas por un ser vivo [3].

Cepario: Colección de microorganismos: bacterias, hongos, virus y parásitos, principalmente, así como parte o productos de ellos; ácidos nucleicos, proteínas o toxinas que se han conservado [5].

Enzimas: Las enzimas son biocatalizadores (es decir compuestos de origen biológico) que aceleran las reacciones químicas [6].

Estéril: Ambiente que no cuenta con presencia de microorganismos [7].

Inerte: Sinónimo de inactivo, aplicado a un residuo o producto significa que este resulta inalterable ante determinados agentes exteriores, ya sean físicos, químicos o biológicos. Cuando se habla de un residuo inerte es aquel que no podrá contaminar por acción de los mencionados agentes, una vez depositado o almacenado [8].

Inertización: Cualquier proceso que tienda a hacer inerte un residuo [8].

ISO: La Organización Internacional de Normalización

Microorganismos: Seres vivos diminutos que individualmente suelen ser demasiado pequeños para ser observados a simple vista. El grupo incluye las bacterias, hongos (levaduras, mohos, hongos filamentosos), protozoos, algas microscópicas y virus [9]

Microorganismos anaerobios: Son microorganismos que pueden vivir en ausencia de oxígeno atmosférico [10].

NTP: Notas técnicas de prevención.

Reservorio: lugar donde, de forma natural, se encuentra un organismo [3].

RESPEL: Residuo Peligroso

Sanitizante: Es el agente/producto que reduce el número de bacterias a niveles seguros de acuerdo a normas de salud [11].

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

3. GENERALIDADES

3.1. Quienes deben aplicar el protocolo

El siguiente protocolo lo deben aplicar los comités de infecciones intrahospitalarias que se reglamentan en el decreto 3518 de 2006 del Ministerio de Salud y Protección Social, quienes deben contribuir a mejorar la calidad de los servicios de salud e identificar los factores de riesgo o factores protectores relacionados con los eventos de interés en salud pública y los grupos poblacionales expuestos a dichos factores [12].

3.2. Propósito

Incentivar la aplicación de estrategias como el monitoreo microbiológico del aire en centros de atención médica, con el fin de formular medidas de control para reducir las tasas de adquisición de enfermedades nosocomiales que se reportan en los boletines epidemiológicos. Lo anterior para dar cumplimiento a la política de prevención, control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias establecida en la resolución 073 de 2008 de la Secretaría Distrital de Salud.

4. TIPOS DE MONITOREO

4.1. Impactación directa en medios de cultivo

Las partículas suspendidas en el aire tienden a precipitarse sobre las superficies. Este método consiste en dejar expuesta una caja de Petri con el medio de cultivo sólido seleccionado en las diferentes áreas, con el fin de captar estas partículas.

4.2. Succión

Este procedimiento se basa en el sistema de Impactación de Andersen, el cual consiste en aspirar el aire a través de una tapa perforada. Un ventilador radial, controlado por un sensor de flujo, regula con precisión el flujo de aire en tiempo real. El aire aspirado impacta con un medio de crecimiento en una placa de contacto [13].

El sistema aspira un caudal constante de 100 litros por minuto, regulando automáticamente el caudal de acuerdo a la presión y temperatura ambiental. Si la corriente de aire fuese irregular a causa de factores externos, o bien fuera interrumpida o limitada por capsulas de Petri sobrecargadas, la cantidad de aire será automáticamente reajustada [13], [14].

5. DESARROLLO

5.1. Características del lugar

- Determinar las dimensiones de la zona a monitorear.
- Determinar fuentes de contaminación cercana, (ubicación del centro de atención médica).
- Determinar el estado de la infraestructura y materiales de construcción de los pisos, paredes, techos, puertas y ventanas; lo anterior debido a que esto influye en la facilidad de limpieza del área y en la generación de reservorios para los microorganismos.
- Identificar puntos críticos de control como puertas, ventanas, zonas en donde la infraestructura se encuentre deteriorada, la ubicación de los sistemas y ductos de aireación. Este último debido a que influyen en las fases de formación de un bioaerosol; reservorio, amplificación y aerosolización.

5.2. Materiales, insumos y equipos

Se sugiere el empleo de algunos materiales, pero estos pueden variar según la consideración de quien aplique este protocolo.

- Muestreador de aire que cumpla con las especificaciones de la norma ISO14698-1.
- Cajas de Petri (en caso de utilizar el muestreador de aire es necesario que cumplan con las dimensiones requeridas). Se recomienda el uso de cajas de Petri desechables, dada su facilidad de manipulación y a que se pueden disponer después de su uso.
- Medios de cultivo: para el monitoreo se recomienda utilizar medios de cultivo que permitan el crecimiento de hongos, bacterias Gram positivas y Gram negativas, y microorganismos anaerobios.
- Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, cofias, bata de laboratorio.
- Pruebas bioquímicas para identificación de microorganismos.
- Reactivos para tinción de Gram
- Microscopio
- Campana de anaerobiosis
- Autoclave
- Mechero
- Incubadora
- Nevera

5.3. Cálculo de puntos de muestreo

Para la determinación del número de puntos de muestreo, se sugiere la aplicación de la metodología de la parte 1 de la ISO 14644 con respecto a las áreas limpias y ambientes controlados asociados [15].

Tabla 1. Número mínimo de puntos de muestreo dependiendo del área de sala limpia según ISO 14644-1

Área de sala limpia (m ²) de menos o igual a	Número mínimo de puntos de muestreo a probar (NL)
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10
56	11
64	12
68	13
72	11
76	15
104	16
108	17
116	18
148	19
156	20
192	21
232	22
276	23
352	24
436	25
636	26
>1000	Aplicar ecuación

Fuente: Normalización, capacitación, certificación - Cambios en la ISO 14644-1&2 y los impactos en la GMPS [16].

- Si el área de la sala es mayor a 1000 m² se debe aplicar la siguiente ecuación:

$$N_L = 29 * \left(\frac{A \text{ m}^2}{1000 \text{ m}^2} \right)$$

Donde:

N_L = Número mínimo de puntos de muestreo
A = Área total de zona a monitorear (m²)

- Si el área de la zona se encuentra entre dos valores de la tabla, el mayor de los dos debe ser seleccionado.

5.4. Cálculo de número de muestras

Para que los resultados obtenidos a partir del monitoreo sean estadísticamente significativos, se recomienda realizar como mínimo tres repeticiones por punto de muestreo y por cada medio de cultivo seleccionado.

Ejemplo:

Área establecimiento: 25 m²

N_L= 7

Repeticiones (R)= 3

*Número de medios de cultivo (C_L)= 4

Número total de muestras por monitoreo: N_L* R*C_L= 84

* El número de medios de cultivo varía de acuerdo a las consideraciones e interés de quien aplique el monitoreo (ver numeral 5.2).

5.5. Monitoreo

Antes de realizar el monitoreo es necesario el tener los elementos de protección personal (Guantes, Tapabocas, Cofia, Bata de laboratorio) con el fin de garantizar que no se alteren las muestras por la manipulación de los instrumentos.

Por otro lado es necesario preparar los medios de cultivo seleccionados de manera previa (Ver anexo I).

Los puntos de muestreo deberán ser distribuidos de manera equidistante en la zona a monitorear con el fin de abarcar toda el área de interés.

Dependiendo el método de monitoreo a desarrollar se seguirán las siguientes metodologías:

- Succión:

Antes de utilizar el equipo muestreador de aire es necesario verificar que este se encuentre calibrado y funcione correctamente. Luego se debe desinfectar con un sanitizante no abrasivo (por ejemplo, alcohol al 70%).

- Verifique la esterilidad de los medios de cultivo seleccionados.

- Ubique el equipo en el punto de muestreo a una altura entre 1 y 1.5 m.
 - Encienda y programe el equipo según el caudal seleccionado para el monitoreo.
 - Retire el cabezal del equipo.
 - Introduzca la caja de Petri cerrada sobre el soporte del equipo y retírele la tapa. Guarde la tapa en una bolsa hermética durante la toma de muestra.
 - Coloque el cabezal inmediatamente y retire el guardapolvo en el mismo instante en el que inicie la toma de muestra.
 - Coloque el guardapolvo en el equipo en el instante en que finaliza la toma de muestra.
 - Retire el cabezal del equipo y tape la caja de Petri.
 - Rotule la caja de Petri con el día, punto de muestreo y medio de cultivo utilizado.
 - Realizar el monitoreo con los demás medios de cultivo.
 - Realizar las repeticiones correspondientes, de acuerdo con el área de sala (m²) que se define en la tabla 1.
 - Desinfecte el cabezal y el guardapolvo.
 - Recargue el equipo según la frecuencia de muestreo y el tiempo de duración de la batería.
- Impactación directa:
 - Verifique la esterilidad de los medios de cultivo seleccionados.
 - Ubique las cajas de Petri en los punto de muestreo
 - Retírele la tapa de la caja de Petri y guarde la tapa en una bolsa hermética durante la toma de muestra.
 - Dejar expuestas las cajas de Petri por un tiempo de 15 minutos [17].
 - Tape la caja de Petri y rotúlela con el día, punto de muestreo y medio de cultivo utilizado. Presérvelas
 - Realizar el mismo procedimiento, para las diferentes repeticiones y los diferentes medios de cultivo.

De manera paralela y para los dos métodos de monitoreo, se recomienda registrar datos de temperatura y humedad relativa con el fin de identificar las relaciones existentes entre variables. Esta información se puede recolectar con un termohigrómetro, que además permite registrar valores de velocidad del viento en caso de que se presenten corrientes de aire.

Se recomienda registrar estas variables en formatos junto con las observaciones que se hagan al momento de monitorear (Ver anexo II).

5.6. Seguimiento

A través del correcto manejo, cuidado y preservación de las muestras, desde su recolección hasta su análisis, se pueden obtener resultados confiables. A partir de esto se sugiere llevar un control antes y después de cada procedimiento.

- Transporte: Transportar las cajas de Petri en condiciones de asepsia, garantizando la seguridad de estas, evitando el movimiento excesivo y que puedan llegar a abrirse y contaminarse.
- Laboratorio: El manual de bioseguridad en el laboratorio desarrollado por la Organización Mundial de la Salud, sugiere que los laboratorios de contención, tienen un nivel de bioseguridad 3 ya que está concebido e instalado para trabajar con microorganismos del grupo de riesgo 3 (“agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro”). Debido a los riesgos a los que está sujeto el personal al momento de trabajar en este, se recomienda adoptar las directrices que se establecen en el manual en cuanto a protección personal (guantes, tapabocas, cofia, bata de laboratorio), a los procedimientos, al cuidado de las zonas de trabajo, a la utilización de materiales y equipos, y a los procedimientos de manipulación y eliminación de material y desechos contaminados. Además, la adopción de estas directrices contribuye a la confiabilidad de los resultados del análisis [18].

Según los tipos de microorganismos que se quieran monitorear se deberán garantizar las condiciones de crecimiento.

- Hongos: Temperatura ambiente.
- Anaerobios: Se debe simular una atmósfera anaerobia, por lo que se recomienda introducir las muestras en la campana de anaerobiosis junto con el componente activo que permita absorber el oxígeno y el dióxido de carbono. Una vez realizado esto, se deberá introducir en incubadora durante 24 a 48 horas a una temperatura de 37 grados, con el fin de simular la temperatura del cuerpo humano y acelerar el crecimiento de los microorganismos.
- Aerobios: Se introducirán en la incubadora a una temperatura de 37 grados durante 24 a 48 horas.

5.7. Cuantificación de colonias

Realizar el conteo de las colonias de manera manual en las muestras obtenidas, distinguiendo los diferentes morfotipos.

El número de colonias obtenido se debe corregir a través de la tabla de Feller (Ver anexo III), el cual se basa en el siguiente principio: A mayor cantidad de microorganismos en cada toma de muestras, aumenta la probabilidad de que penetren varios microorganismos por el mismo orificio de la tapa del equipo.

El número de colonias presentes por metro cúbico de aire se estima mediante la fórmula establecida por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en la NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire [19].

$$n^{\circ}ufc/m^3 = \frac{NC \times 1000}{V}$$

Donde:

NC: Número de colonias por placa

V: Volumen de muestreo (litros)

5.8. Caracterización

Se recomienda la elaboración de un cepario para facilidad de identificación de microorganismos y para ahorrar insumos (se sugiere realizar el análisis de las muestras en laboratorios externos a los centros de salud). (Ver anexo IV).

Una vez se tienen aislados los microorganismos se debe realizar la tinción según corresponda.

- Tinción de Gram: A través de la metodología de tinción (Ver anexo V) se realiza la identificación de bacterias según su estructura y grosor de pared bacteriana, ya que las Gram positivas no se decoloran porque su pared de peptidoglicano es gruesa, contiene pocos lípidos y dificulta la penetración de alcohol que pudiera extraer el colorante, generando una tonalidad morada; mientras que las Gram negativas adquieren una tonalidad rosada [20].

Es necesario realizar este procedimiento con el fin de verificar que se encuentre un solo tipo de célula, para que al momento de realizar las pruebas bioquímicas para la identificación no se presenten cruces de datos.

- Caracterización de hongos: Se realiza tinción con azul de lactofenol para posteriormente analizar en microscopio y así determinar los hongos de acuerdo a su estructura.

Para identificar bacterias aerobias y anaerobias se recomienda el uso de pruebas bioquímicas, que permiten diferenciar bacterias de acuerdo a la reacción de las enzimas de estas con diferentes sustratos deshidratados.

- Índice Analítico de Perfil (API): Los sistemas miniaturizados API son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos mediante un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere.

Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras.

A continuación se indican algunas pruebas específicas para llegar a una aproximación de la especie a partir del género que pertenece:

- API 20E: Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos Gram negativos.
 - API 20STREP: Permite la identificación de estreptococos, enterococos y bacterias emparentadas.
 - API STAPH: Permite la identificación de estafilococos y micrococos
 - API 20A: Permite la identificación de microorganismos anaerobios.
- Medios de cultivo:

Los medios de cultivo son utilizados para diferentes propósitos; entre estos el aislamiento de ciertos tipos de microorganismos y su identificación. Con base en su uso o función se clasifican como medios selectivos, diferenciales, selectivo-diferenciales, entre otros [21].

- Medios selectivos: Favorece el crecimiento de ciertas bacterias e inhibe el de otras. Dentro de este tipo de medio se encuentra el agar sal, que posee una concentración de cloruro de sodio (NaCl) del 10% facilitando el crecimiento de *Staphylococcus aureus* [21].
- Medios diferenciales: Permite distinguir diferencias metabólicas de diversas especies o géneros de microorganismos o de ciertos grupos de los mismos, mediante la adición de alguna sustancia que pueda ser metabolizada solo por los microorganismos de interés [21].

- Medios selectivo-diferenciales: Permite la selección de un tipo de microorganismo y brinda información sobre sus características metabólicas [21].

5.9. Descarte de material

- Material biológico.

Se debe tener en cuenta que los residuos generados en el análisis de calidad microbiológica se tratan de residuos peligrosos con características infecciosas (agentes patógenos), a los cuales se les debe dar un tratamiento previo a su disposición final, por lo cual una vez analizadas las muestras, los materiales (cajas de Petri, medios de cultivo contaminados y material desechable contaminado) se deben almacenar en bolsas plásticas resistentes a altas temperaturas para posteriormente desactivarlos en autoclave. Por último se deben almacenar en bolsas rojas indicando riesgo biológico y se debe contactar a la empresa encargada de la recolección y disposición final del material.

- Residuos químicos peligrosos.

Depositar los residuos químicos en contenedores apropiados de acuerdo a sus características de peligrosidad, el volumen generado y su compatibilidad con otros residuos. Estos contenedores deben ser preferiblemente de cierre hermético y deben presentar resistencia a golpes.

Tener en cuenta los principios establecidos en la Norma Técnica Colombiana NTC 1692, en donde se establece el rotulado, etiquetado y descripción de los envases que se utilizan para el acondicionamiento de RESPEL.

5.10. Procesamiento Datos

Se recomienda la aplicación de la estadística descriptiva para presentar, analizar e interpretar datos de una forma objetiva y útil, para que la información resulte confiable y exprese los contenidos en un lenguaje de fácil comprensión para que se puedan establecer comparaciones [22].

a) Determinación del Promedio de partículas por punto de muestreo:

$$Xi: \frac{X1 + X2 \dots + Xn}{n}$$

Donde:

X_i = Concentración Promedio localización i
 X_1 a X_n = Concentración individual de partículas
 n = Número de muestreos por puntos de muestreo

b) Determinación del Valor Medio del Promedio:

$$X_p = \frac{X_{i1} + X_{i2} \dots + X_{im}}{m}$$

Donde:

X = Valor medio de los promedios por localización.
 X_{i1} a X_{im} = Valores promedios por localización individual
 m = Número de puntos de muestreo

c) Determinación de la Desviación Estándar

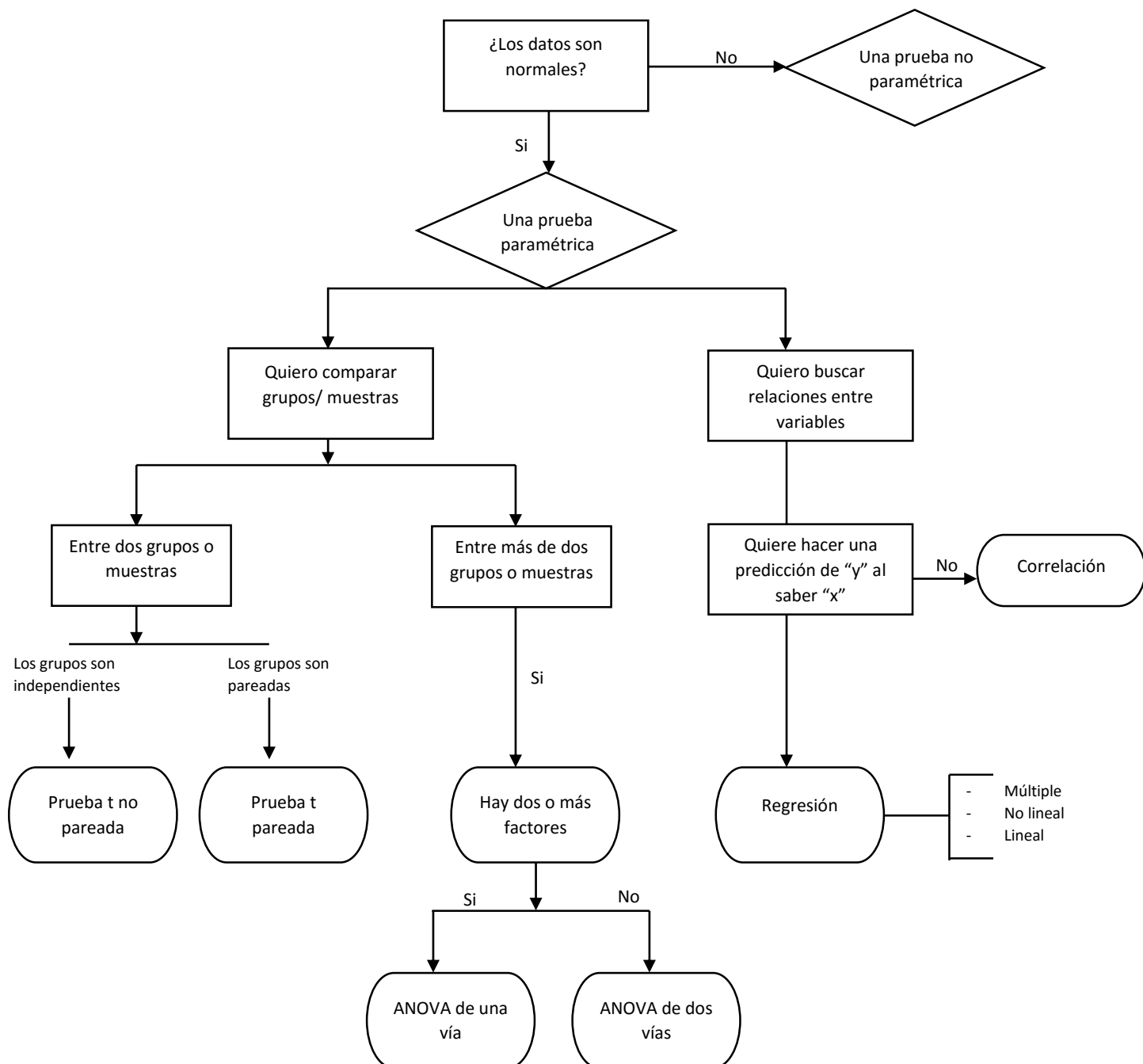
$$S = \sqrt{\frac{(X_{i1} - X_{p1})^2 + (X_{i2} - X_{p2})^2 \dots + (X_{in} - X_{pn})^2}{(m - 1)}}$$

Donde:

S = Desviación estándar
 X_{i1} a X_{in} = Valores promedios por localización individual
 X_{p1} a X_{pn} = Valores medios del promedio por localización
 m = Número de puntos de muestreo

Así mismo es recomendable utilizar estadística inferencial la cual permite correlacionar las variables analizadas. En la imagen 1 se observan los diferentes análisis que se pueden realizar, de acuerdo a las características de los datos y a la hipótesis planteada.

Imagen 1. Flujo de pruebas paramétricas



Fuente: Guía de aplicación de pruebas estadísticas en el programa Systat 7.0 para ciencias biológicas y forestales [23].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Herpimar, *Rocmaquina*, vol. 97, p. 78, 2005.
- [2] L. Silva Garcia , J. M. Perez Santana y C. R. Junquera Velasco, «Limpieza del instrumental e higiene del medio hospitalario,» vol. I, Sevilla, MAD - Edufarma, 2006.
- [3] Insituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, «NTP 288: Síndrome del edificio enfermo: enfermedades relacionadas y papel de los bioaerosoles,» Madrid.
- [4] V. Garcia, de *Introduccion a la microbiologia*, Universidad estatal a distancia, p. 47.
- [5] «BM Editores,» [En línea]. Available: <http://bmeditores.mx/cepario-nacional-de-salud-animal/>. [Último acceso: 3 Marzo 2016].
- [6] J. Koolman, «Bioquimica: Texto y Atlas,» Madrid, Panamericana, 2004, p. 156.
- [7] Universidad de Navarra, «Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos,» Pamplona.
- [8] F. Roman Ortega, «Diccionario de medio ambiente y materias afines,» FC Editorial, 1999, p. 133.
- [9] B. R. F. C. L. C. Gerard J. Tortora, de *Introduccion a la Microbiologia*, Buenos Aires, Panamericana, 2007, p. 2.
- [10] M. Negroni, de *Microbiologia Estomatologica*, Buenos Aires, Panamericana, 2009, p. 49.
- [11] MERCOSUR, «Código del MERCOSUR: tratado, protocolos, acuerdos, declaraciones, decisiones, resoluciones, directivas, recomendaciones,» Buenos Aires, 1996, p. 6074.
- [12] Ministerio de la Protección Social., «Decreto 3518 de 2006,» Bogota, 2006.
- [13] Merck Millipore, «MAS -100, Microbial Air Monitoring Systems,» Merck Millipore, Darmstadt, 2012.

- [14] Subdepartamento Higiene y Seguridad Industrial, «Procedimiento muestreo microbiológico del aire,» Instituto de Salud Pública de Chile, Santiago de Chile, 2011.
- [15] Organización Internacional para la Estandarización., ISO 14644-1, Cleanrooms and associated controlled environments, Part 1: Classification of airborne, Ginebra: Organización Internacional para la Estandarización..
- [16] A. E. Gamino, «Normalización, capacitación, certificación - Cambios en la ISO 14644-1&2 y los impactos en la GMPS,» Sociedade Brasileira de Controle de Contaminacao, Cartagena, 2013.
- [17] C. R. N. O. M. B., «Correlación entre pruebas cutáneas positivas a hongos, IgE total, e IgE específica por ELISA y cultivos de hongos en el medio ambiente del paciente pediátrico alérgico.,» *Alérg Mex*, nº 48, pp. 137-140 , 2001.
- [18] Organización Mundial de la Salud, Manual de bioseguridad en el laboratorio., Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2005.
- [19] M. d. . C. Martí Solé , «NTP 299: Método para el recuento de bacterias y hongos en aire,» Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Madrid.
- [20] J. M. Macarulla y F. M. Goñi, Bioquímica Humana, Barcelona: Reverté S.A., 1994.
- [21] V. García Cortés, Introducción a la microbiología, San José: Universidad Estatal a Distancia, 2004.
- [22] H. Llinás Solano y C. Rojas Alvarez, Estadística descriptiva y distribuciones de probabilidad, Barranquilla: Uninorte, 2006.
- [23] J. C. Herrera F. y L. E. Carse, Guía de aplicación de pruebas estadísticas en el programa Systat 7.0 para ciencias biológicas y forestales., Santa Cruz: Chemonics International, 2000.
- [24] SERAMIX, «SERAMIX,» 2 Mayo 2013. [En línea]. Available: seramix.blogs.uv.es. [Último acceso: 25 01 2016].

ANEXOS

ANEXO I: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA BOGOTÁ	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
Materiales Erlenmeyer Agua Destilada Alcohol Algodón Probeta Papel Aluminio Espátula Bolsas con cierre hermético Cajas de Petri estériles Medios de cultivo de interés	Procedimiento - Determinar el número de cajas de Petri y el volumen de medio a preparar, teniendo en cuenta que para una caja de Petri de 90mm se requiere entre 15 y 20 ml de medio de cultivo. - Calcular la cantidad de medio de cultivo y el volumen de agua destilada de acuerdo a las especificaciones de preparación - Disolver y tapar con papel aluminio. Calentar y agitar hasta obtener una mezcla homogénea y un color a cristalino en el medio. - Esterilizar los medios de cultivo en autoclave - Esterilizar la superficie de trabajo. - Situar las cajas de Petri en la cámara de flujo laminar o cerca al mechero, y sirva el medio de cultivo antes de que este se solidifique - Rotule y empaque las cajas preparadas en bolsas herméticas. - Refrigerar de 2 a 6° C hasta su uso. Se recomienda que al momento de utilizar las cajas con los medios se verifique la esterilidad de estos.
Equipos Plancha de calentamiento Báscula Cámara de flujo laminar o mechero Autoclave Agitador Magnético <i>Imagen 2. Preparación de medio de cultivo.</i>  Fuente: Autores	

ANEXO IV: AISLAMIENTO DE COLONIAS

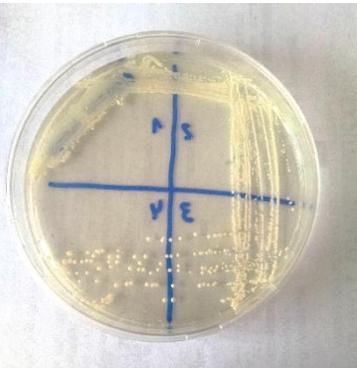
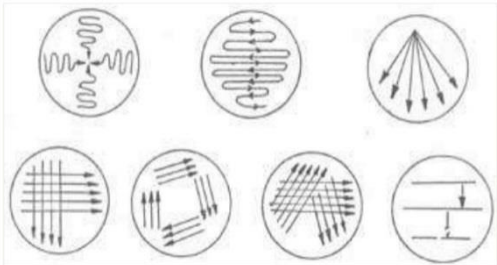
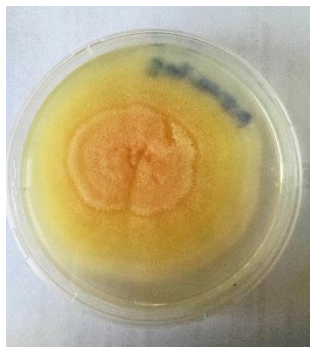
 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA BOGOTÁ	AISLAMIENTO DE COLONIAS
Materiales y equipos Cajas con muestras para aislar Cajas con medios estériles Asa bacteriológica Asa de micología Algodón Alcohol Mechero <i>Imagen 3. Bacteria aislada por agotamiento.</i>  Fuente: Autores <i>Imagen 4. Autoclave.</i>  Fuente: Autores	Procedimiento Bacterias - Desinfecte el área de trabajo, junto con los materiales a utilizar. - Localice las cajas con muestras para aislar y las cajas con medios estériles cerca al mechero. - Incinere el asa bacteriológica para garantizar que no se contamine la muestra a aislar. - Tome una pequeña cantidad de muestra de la colonia a aislar y distribúyala sobre la superficie del medio de cultivo de acuerdo al trazado seleccionado.  Fuente: SERAMIX [24]. Es importante resaltar que se debe incinerar el asa bacteriológica entre cada trazo y al final del aislamiento. - Incubar las cajas de Petri a 37° C durante un periodo de 24 a 48 horas. Para bacterias anaerobias lleve a incubar en la campana de anaerobiosis.

Imagen 5. Hongo aislado.



Fuente: Autores

Hongos

- Desinfectar el área de trabajo, junto con los materiales a utilizar.
- Localice las cajas con muestras para aislar y las cajas con medios estériles cerca al mechero.
- Incinere el asa de micología para garantizar que no se contamine la muestra a aislar.
- Trace una X en la mitad del medio de cultivo estéril para enfriar el asa. Tome una pequeña cantidad de muestra y deposítela en la mitad de la X.
- Almacene las muestras aisladas a temperatura ambiente.

ANEXO V: TINCIÓN

 UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS PRIMER CLAUSTRO UNIVERSITARIO DE COLOMBIA BOGOTÁ	TINCIÓN
Materiales y equipos Alcohol Algodón Asa bacteriología Asa de micología Portaobjetos Cubreobjetos Agua destilada Topper de tinción Reactivos : Cristal Violeta Lugol Alcohol Acetona Fucsina Azul de Lactofenol  Fuente: Autores	Tinción de Gram. (Bacterias) Procedimiento - Desinfecte el área de trabajo, junto con los materiales a utilizar. - Localice las cajas con la muestra aislada. - Desinfecte el portaobjetos en que se va a tomar la muestra para tinción. - Incinere el asa bacteriológica para garantizar que no se contamine la muestra a aislar. - Agregue una gota de agua destilada y distribúyala con el asa en el centro de la lámina portaobjetos en aproximadamente 2 cm. - Tome una pequeña cantidad de muestra de la colonia aislada y frótela en la gota de agua. Incinere el asa. - Fije la muestra en el portaobjetos pasándola tres veces por la llama del mechero. Tinción: - Agregue una gota de cristal violeta y espere dos minutos. Lave con agua destilada. - Agregue una gota de Lugol y espere dos minutos. Lave con agua destilada.

	- Agregue una gota de alcohol acetona y espere 30 segundos. Lave con agua destilada. - Agregue una gota de fucsina y espere 15 segundos. Lave con agua destilada y deje secar.
	Hongos: Procedimiento - Desinfecte el área de trabajo, junto con los materiales a utilizar. - Localice las cajas con la muestra aislada. - Desinfecte el portaobjetos en que se va a tomar la muestra para tinción. - Incinere el asa de micología para garantizar que no se contamine la muestra a aislar. - Agregue una gota de azul de lactofenol en el centro de la lámina portaobjetos. - Tome una pequeña cantidad de muestra de la colonia aislada y frótela en la gota del azul de lactofenol Incinere el asa. - Tape la muestra con el cubreobjetos.