


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a red tunic and a white hat, possibly a saint or a historical figure, standing on a white horse. The background is a light blue sky with a golden sun or moon at the top. The seal is surrounded by a grey border containing the Latin text "ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CAETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA".

Optimización del diagnóstico bacteriológico de los líquidos corporales por medio de la recuperación de bacterias en fagocitos a través de lisis celular utilizando la técnica de choque osmótico

Diego Monterroso Rodríguez

Químico Biólogo

Guatemala, noviembre de 2018

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**Optimización del diagnóstico bacteriológico de los líquidos corporales por medio de la
recuperación de bacterias en fagocitos a través de lisis celular utilizando la técnica de
choque osmótico**

INFORME DE TESIS

Presentado por

Diego Monterroso Rodríguez

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, noviembre de 2018

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
Licda. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza, M.A.	Secretaria
M.Sc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlo Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Byron Enrique Pérez Díaz	Vocal IV
Br. Pamela Carolina Ortega Jiménez	Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS

A corazón del cielo, corazón de la tierra, a nuestros formadores, nuestra madre tierra, por darnos la vida y la oportunidad de caminar por este mundo.

A MIS ABUELAS, ABUELOS Y ANCESTROS

Cuya vida me hace quien soy ahora, especialmente a mis abuelas Aida Torres, Julia Méndez (Q.E.P.D.), mi abuelo Ricardo Monterroso (Q.E.P.D), gracias por todo lo que me enseñaron con su vida.

A MI FAMILIA

Quienes se mantienen siempre cerca, en especial a mi mamá Ivonne Rodríguez, mi papá Ricardo Monterroso, mis hermanas Irene y Rocío, y mi sobrino Rodrigo, por estar siempre conmigo y ser las mejores personas para acompañarme por la vida.

A QUIENES ME APOYARON

Con grandes o pequeñas actividades, con apoyo incondicional, estos actos de amistad y amor son lo que vuelve el mundo mejor: Irene, Renato, Huberto, Anita, Grethel, Ale, Stephanie, Vinicio, Verónica, Eva, Manuel, y demás.

AGRADECIMIENTOS

AL PUEBLO DE GUATEMALA

Por la inversión tan necesaria realizada en la educación superior, sin ella no hubiera podido completar mis estudios.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

En especial a la Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia por ser mi casa de estudios y formarme como profesional en todos los sentidos. A las personas que conocí ahí, docentes, amigos y amigas.

A MIS ASESORES

Lic. M.Sc. Martín Gil y Lic. Antonio Galindo, sin su valiosa ayuda, guía, paciencia y colaboración no hubiera sido posible completar este estudio.

A MI REVISORA

Lic. M.A. Isabel Gaitán, por la paciencia, apoyo y perspectiva en la elaboración de este estudio.

AL PERSONAL DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS

Por tomarse el tiempo dentro de sus actividades para apoyarme con el procedimiento experimental.

A TODAS LAS PERSONAS

Que me apoyaron con aquellas acciones y palabras que otros considerarían pequeñas pero que son de gran ayuda.

ÍNDICE

Págs.

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	3
	A. Líquido cefalorraquídeo	4
	B. Líquido ascítico	9
	C. Líquido pleural	11
	D. Líquido pericárdico	13
	E. Líquido sinovial	14
	F. Análisis de los líquidos corporales	15
	G. Recuperación bacteriana	17
	H. Técnicas alternativas de lisis celular	19
IV.	JUSTIFICACIÓN	21
V.	OBJETIVOS	22
	A. Objetivo general	22
	B. Objetivos específicos	22
VI.	HIPÓTESIS	23
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
	A. Universo de trabajo y muestra	24
	B. Recursos	24
	C. Materiales y Métodos	25
	D. Diseño de la investigación	29
VIII.	RESULTADOS	32
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
X.	CONCLUSIONES	41
XI.	RECOMENDACIONES	42
XII.	REFERENCIAS	43

I. RESUMEN

La utilización de soluciones que generan lisis celular para la liberación de bacterias atrapadas dentro de células fagocíticas ha sido ampliamente descrita por diversos autores, incluyendo a Forbes, 2009, quien específicamente recomienda realizar un proceso lítico previo al cultivo. Este procedimiento se ha utilizado en líquidos corporales para reducir el número de resultados falsos negativos, mejorando el diagnóstico de enfermedades infecciosas y acortando el número de muestras tomadas a un mismo paciente. El método más sencillo es el choque osmótico, ya que no requiere de equipo y es de bajo costo.

En el presente estudio se analizaron 114 líquidos corporales (líquidos peritoneales, sinoviales, cefalorraquídeos, pericárdicos y pleurales), los cuales fueron enfrentados a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0.1%, 0.3% y 0.6%) y agua destilada. Al compararse los resultados con los diferentes tratamientos se logró una recuperación hasta del 16.67% con las soluciones hipotónicas contra un 9.65% con el método de referencia. Se analizó esta diferencia con la prueba Q de Cochran, encontrando que no es estadísticamente significativa, por lo que se puede utilizar el método de referencia o el tratamiento por choque osmótico, preferiblemente este último ya que demostró ser eficaz para mejorar la recuperación de bacterias en fagocitos.

Se considera conveniente replicar este estudio utilizando solamente una solución salina hipotónica al 0.1% o agua destilada estéril, debido a que fueron las que obtuvieron un mayor porcentaje de recuperación bacteriana, ésto con el fin de incluir una mayor cantidad de muestras y poder obtener una diferencia estadísticamente significativa. También realizar el choque osmótico al mismo tiempo que el cultivo de referencia para manipular al mínimo las muestras, y eliminar cualquier posibilidad de que los resultados divergentes sean por un sesgo producido por la diferencia en tiempo en que fueron realizadas las dos metodologías.

II. INTRODUCCIÓN

En el Hospital General San Juan de Dios, el área dedicada a los líquidos corporales, analiza de forma rutinaria los siguientes líquidos: cefalorraquídeo, peritoneal, pleural, sinovial, pericárdico y seminal. El análisis de rutina incluye un examen macroscópico, citológico, microbiológico y bioquímico (Padrós, Galán, Guillén, Hortas, Marín y Noguera, 2004). Dependiendo del líquido a analizar y el tipo de microorganismo del cual se sospecha que sea el causante de la infección, se realizan ciertas variantes en el procedimiento. A todos los líquidos se recomienda hacer un examen microscópico directo y reconcentrarse por medio de centrifugación previo al cultivo.

Las características fisiológicas de los líquidos corporales muchas veces no permiten que las bacterias se encuentren suspendidas en él, sino dentro de células fagocíticas. Es por ello que este estudio pretendía, aumentar la recuperación bacteriana y así mejorar el cultivo, liberando las bacterias fagocitadas a través del procedimiento de lisis leucocitaria por choque osmótico, debido a que este procedimiento en particular ha demostrado ser efectivo, barato y simple de ejecutar, siendo ideal para aplicarlo.

Se incluyeron dentro del estudio las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión (volumen mínimo de 500 μL y un conteo de al menos 5 leucocitos/ mm^3) por un periodo de tres meses. Con este procedimiento se esperaba poder mejorar este proceso para evitar resultados falsos negativos, reduciendo el número de veces que se repite la toma de muestra, siendo procesos traumáticos y que retardan el diagnóstico. Se pretendía identificar la dilución ideal determinando la eficacia de la recuperación de bacterias por cada una de ellas, con la finalidad de mejorar el proceso, y aplicarlo dentro de la rutina del laboratorio.

III. ANTECEDENTES

El cuerpo humano debido a su anatomía contiene diferentes cavidades, las cuales están llenas en su mayoría por líquido. Estos líquidos son formados por ultrafiltración del plasma, manteniendo un equilibrio en su volumen, en caso se altere este equilibrio ocurren los llamados derrames (Strasinger y Di Lorenzo, 2010). Con base al tipo de etiología por la que ocurre un derrame, los líquidos pueden clasificarse en transudados y exudados; los primeros son aquellos en los que un trastorno sistémico altera el equilibrio en la regulación de la filtración y reabsorción y los segundos, son debidos a infecciones o malignidades que afectan las cavidades o las membranas que las conforman. (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

Estos líquidos corporales son por su naturaleza estériles, por lo que una infección en ellos es muy evidente (Forbes, Sahm & Weissfeld, 2009). En caso de encontrarse una infección se produce un derrame de líquido de tipo exudativo, el cual se caracteriza por contener una mayor cantidad de proteínas y células, principalmente leucocitos polimorfonucleares (Arias, Aller, Arias y Aldamendi, 2000). Los polimorfonucleares y mononucleares son células fagocíticas que se encuentran residentes en los tejidos y en la circulación periférica (Male, Brostoff, Roth & Roitt, 2007) y por ende también dentro de los líquidos donde algún agente bacteriano ha producido infección. Por lo anterior, la finalidad del análisis de los líquidos corporales es la identificación del agente causal, esto implica una tinción de Gram y cultivo.

A continuación se describen los líquidos incluidos en el estudio, el líquido seminal se excluye debido a que no se solicita un cultivo de rutina en el laboratorio donde se realizará el estudio, así como el líquido amniótico que no se trabaja de rutina.

A. LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

1. Descripción

El líquido cefalorraquídeo es un líquido claro, incoloro y con alto contenido de proteínas que se encuentra rodeando al sistema nervioso central, es producido en parte en los plexos coroideos (red vascular parecida a vellosidades ubicada en la piamadre) y en mayor medida por los capilares de la cavidad subaracnoidea del cráneo, y la médula espinal, así como perivascularmente en el epéndimo y el parénquima (Liem, 2006).

2. Función

- Protección del cerebro y de la médula espinal de golpes.
- Recoger los desechos del metabolismo y proporcionar nutrientes del cerebro, piamadre y aracnoides.
- Regulación de la composición química.
- Mantener al cerebro libre de bacterias y virus, teniendo una función parecida a la de la linfa (Liem, 2006).

3. Volumen normal

La cantidad secretada es de unos 20 a 40 mL/hora produciéndose en total aproximadamente 1,000 mL/día, haciendo un recambio entre tres y seis veces al día. Alrededor de 140 mL de líquido cefalorraquídeo se encuentra en las cavidades internas y externas, de las cuales menos de 20 mL bañan la médula espinal (Liem, 2006).

4. Obtención

Se puede obtener por punción lumbar, cisternal o ventricular, siendo la primera la más habitual debido a su fácil ejecución e inocuidad habitual, aunque no está libre de riesgos por lo que no debe realizarse indiscriminadamente (Rojo y Barbera, 1992).

La punción lumbar se realiza con una aguja llamada broca entre los espacios intervertebrales L3-L4, L4-L5 o L5-S1. Generalmente se colectan tres porciones, siendo la tercera porción la más clara aunque la punción haya sido traumática, se recomienda usar la

porción más turbia para microbiología (Anzolane, Arenas, Ballasté, Bazet, Blanco, Legnani, et. al., 2004).

En la punción cisternal o suboccipital se recomienda la inserción de medios de contraste, se realiza en la parte posterior del cuello, entre la protuberancia occipital externa y la apófisis espinosa del axis. Se efectúa atravesando el ligamento occípito-atloideo, con cuidado de no puncionar el bulbo raquídeo. La punción ventricular solo está indicada en procesos neuroquirúrgicos. En los lactantes ésta se realiza a través de la fontanela; en los adultos previamente debe efectuarse un agujero en el hueso craneal, frontal u occipital, a través de los cuales, y mediante la cánula de Dandy se efectúa esta punción. El riesgo de lesión cerebral se aumenta al hacer repetidas punciones al no encontrar el ventrículo lateral (Rojo y Barbera, 1992).

5. Valores Normales

- Sodio: 137 - 145 meq/L (137 - 145 mmol/L)
- Potasio: 2,7 - 3,9 meq/L (2,7 - 3,9 mmol/L)
- Calcio: 2,1 - 3,0 meq/ (1,0 - 1,5 mmol/L)
- Magnesio: 2,0 - 2,5 meq/L (1,0 - 1,2 mmol/L)
- Cloruro: 116 - 122 meq/L (116 -122 mmol/)
- pH: 7.31 - 7.34
- Glucosa: 40 - 70 mg/dL (2,22 3,89 mmol/L)
- Proteínas totales: 40 - 70 mg/dL (2,22 3,89 mmol/L)
- (Líquido Céfalorraquideo (LCR), s.f)
- Eritrocitos: 0 – 500 células / μ L
- Leucocitos: 0 - 18 células/ μ L (Elias, s.f.)
- Recuento diferencial:
 - Linfocitos: 60 - 70 %
 - Monocitos: 30 - 50 %
 - Neutróflos: ninguno (Líquido Cefalorraquídeo (LCR), s.f)

6. Patología

La punción lumbar se realiza con muchos fines:

- Detectar una enfermedad del sistema nervioso central.
- Introducir medicamentos o contraste radiológicos.
- Disminuir la presión intracraneal.
- Valorar ciertos trastornos electrolíticos que la sangre no puede reflejar.
- Extraer sangre o exudado del espacio subaracnoideo (Díaz, Fernández y Parede, 1997).

7. Análisis

Como todos los líquidos corporales su análisis incluye un análisis citológico, en el que se realiza un recuento de leucocitos y eritrocitos, también un recuento diferencial de los leucocitos.

Si se observan un predominio de polimorfonucleares neutrófilos es sugestivo de meningitis bacteriana, si el predominio es de linfocitos y monocitos se sugiere una meningitis viral, tuberculosa o micótica. (Strasinger y Di Lorenzo, 2010). Los principales patógenos bacterianos que provocan meningitis son *Haemophilus influenzae* tipo B, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*, aunque también es posible encontrar otro tipo de bacterias más variadas como *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis* y más (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2016)

Tabla 1. Prevalencia de agentes causales de meningitis.

Microorganismo	Porcentaje (%)
Bacterias	59.1
Gram positivo	
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	13.6
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4.5
Gram negativo	
<i>Acinetobacter baumannii/haemolyticus</i>	11.4
<i>Enterobacter cloacae</i>	4.5
<i>Escherichia coli</i>	4.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.5
<i>Serratia marcescens</i>	6.8
Otros	
Hongos	40.9
<i>Cryptococcus neoformans</i> (cultivo)	22.7
<i>Cryptococcus neoformans</i> (antígeno)	11.4
<i>Histoplasma capsulatum</i>	4.5
Levadura no identificada	2.3

Fuente: Rivera, Martínez, Melini y Cabrera, 2011.

Debido a esta amplia gama de agentes etiológicos de la meningitis, es importante realizar una identificación pronta y acertada del microorganismo responsable de la infección, cualquier retraso puede evitar un tratamiento oportuno lo cual puede tener serias consecuencias para el paciente.

Tabla 2. Examen macroscópico del LCR y su significado clínico

Aspecto	Causa	Interpretación
Claro cristalino		Normal
Opalescente, turbio, lechosos, nebuloso	Leucocitos	Meningitis
	Microorganismos	Meningitis
	Proteínas	Trastornos que afecta la barrera hematoencefalica Producción de IgG
Aceitoso	Medio de contraste	
Sanguinolento	Eritrocitos	Hemorragia
		Punción traumática
Xantocrómico	Hemoglobina	Hemorragia antigua. Células destruidas por punción traumática
		Bilirrubina
	Caroteno	Concentración sérica elevada
	Proteínas	Trastornos que afectan la barrera hematoencefalica
	Melanina	Melanosarcosma meningeo
Coagulado	Proteína	Trastornos que afectan la barrera hematoencefalica
	Factor de coagulación	Introducidos por punción traumática
Película	Proteína	Trastornos que afectan la barrera hematoencefalica
	Factor de coagulación	Meningitis tuberculosa

Fuente: Strasinger y Di Lorenzo, 2010

B. LIQUIDO ASCÍTICO

1. Descripción

El líquido ascítico o peritoneal, es un líquido claro y transparente, de color amarillo pálido, se encuentra en la cavidad abdominal manteniéndose en equilibrio dinámico por fuerzas que regulan su formación y reabsorción (García, Fernández y Paredes, 1994).

La producción y la reabsorción están sujetas a las presiones hidrostática y coloidal (oncótica) de los capilares que irrigan las cavidades y a la permeabilidad capilar, en condiciones normales la presión coloidal que confiere las proteínas del suero es similar a la de los capilares en ambos lados de la membrana. Por consiguiente, la presión hidrostática en los capilares parietales y viscerales hace que el líquido ingrese entre las membranas (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

2. Función

- Lubricar los órganos viscerales del roce entre ellos.
- Proteger la cavidad abdominal amortiguando en movimientos y traumatismos (García et. al., 1994).

3. Volumen normal

Contiene normalmente una cantidad menor a 50 mL (García et. al., 1994)

4. Obtención

Punción del área abdominal conocida como paracentesis (Strasinger y Di Lorenzo, 2010), o en caso de estar en procesos de diálisis peritoneal, la muestra será la bolsa completa, de la cual se tomará una porción para realizar los análisis correspondientes así como el cultivo en busca de alguna bacteria causante de peritonitis (Anzolane, et. al., 2004).

5. Valores Normales

- Glucosa 75-110 mg/dL (similares a los del suero)
- Amilasa: < 200 U/L en pancreatitis se puede elevar hasta 1.5 veces más que en suero.
- Proteínas: < 3 g/dL en transudados, > 3 g/dL en exudados
- Relación LDH peritoneal/suero: <0.6 U/L
- Eritrocitos: < 100 células / μ L
- Leucocitos: < 300 células / μ L (Elias, s.f.) (Pagana y Pagana, 2014)

6. Patología

A la acumulación de líquido entre las dos membranas peritoneales se denomina ascitis. Las infecciones bacterianas (peritonitis), a menudo como resultado de perforación intestinal o rotura del apéndice y los procesos malignos son las causas más frecuentes de líquidos exudativos (Strasinger y Di Lorenzo, 2010). También es posible encontrar ascitis en infecciones o inflamaciones agudas como apendicitis, colecistitis, úlceras perforadas, diverticulitis, pancreatitis, salpingitis, infecciones pélvicas, cirrosis, presencia de sustancias irritantes, pancreatitis, cuerpos o sustancias extrañas (endógenas o exógenas) como escape anastomótico, contaminantes como sangre, bilis, orina, etc. (Huamán, s.f.)

Este tipo de muestra también es importante debido a la diálisis peritoneal la cual se realiza en pacientes con insuficiencia renal, principalmente pediátricos, este procedimiento permite depurar líquidos y electrolitos, debido a que el peritoneo es una membrana semipermeable a líquidos y solutos. Para ello se inserta un catéter en esta cavidad y se introduce una solución baja en solutos, si se necesita eliminar agua se satura la solución con glucosa, esta solución se mantiene por un tiempo en la cavidad peritoneal y luego es retirado junto con los desechos y el exceso de agua (Rivas y Sánchez, 2014).

Debido a que este tipo de procedimiento generalmente es ambulatorio es muy común encontrar múltiples complicaciones: anemia, diabetes, hipertensión, aunque la más común es la peritonitis debido a la constante manipulación de las bolsas que contiene el líquido de diálisis, así como la composición de los mismos (Ronco, Rosner & Crepaldi, 2012). Se

pueden presentar daños estructurales derivados del empleo de soluciones dialíticas, pudiendo ser daño estructural en las células de esta membrana (Montenegro, Correa, y Riella, 2009). Los dos principales agentes etiológicos son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, dependiendo de la bacteria así será el tratamiento de antibióticos suministrado, debido a que las soluciones de diálisis contienen dentro de su composición antibióticos una infección también implica muchas veces resistencia a antibióticos (Kam-Tao, Szeto, Piraino, Bernardini, Figueredo et al., 2010).

C. LÍQUIDO PLEURAL

1. Descripción

El líquido pleural normal y trasudado es claro y de color amarillo pálido, se obtiene de la cavidad pleural ubicada entre la membrana pleural parietal que reviste la pared del tórax y la membrana pleural visceral que recubre los pulmones (Strasinger y Di Lorenzo, 2010). Las dos cavidades pleurales, derecha e izquierda, no mantienen comunicación entre sí, el perfecto equilibrio entre la formación y la reabsorción de este líquido mantiene su volumen dentro de los límites fisiológicos, lo cual es muy importante debido al funcionamiento pulmonar (García et. al., 1994). Estas fuerzas son las presiones oncóticas e hidrostáticas que ejercen la pared torácica y el pulmón sobre la pleural parietal y la pleura visceral respectivamente, la alteración de estos mecanismos y presiones causa un desequilibrio en el volumen de este líquido (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

2. Función

Proporcionar lubricación entre las membranas parietal y visceral, necesaria para evitar la fricción de los órganos durante el movimiento de expansión y contracción de los pulmones (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

3. Volumen normal

El nivel de normalidad de este líquido es menor a los 15 mL (Silva, García, Gómez, Muñoz, Silva et al., 2006).

4. Obtención

Se conoce como toracentesis la cual se realiza con una jeringuilla y una aguja fina, se trata de realizar una punción aspirativa del espacio pleural que se encuentra ocupado por un fluido líquido o líquido y gaseoso (hidroneumotórax). Una vez elegida la zona por donde se puncionará la pleura y tras esterilizar la piel se introducirá la aguja por un espacio intercostal, procurando que dentro de la jeringuilla haya una presión negativa, tirando del émbolo mientras se introduce la aguja, de esta forma nada más llegar a la cámara pleural se empezará a llenar la aguja, evitando introducirla más y dañar el pulmón (Tamame y Martínez, 2000).

5. Valores Normales

- Glucosa: 60 – 115 mg/dL (similar al valor sérico)
- Proteínas: Relación líquido/suero < 0.5
- Triglicéridos: < 110 mg/dL
- pH: > 7.4 (Pagana y Pagana, 2014)
- Eritrocitos: < 100 células / μ L
- Leucocitos: < 300 células / μ L (Elias, s.f.)

6. Patología

Un derrame pleural se da por un desequilibrio, ya sea por pérdida de la integridad de la membrana pleural, o por alteración de las presiones hidrostáticas, disminución del flujo linfático, también puede ser secundario a un proceso inflamatorio, los microorganismos que se encuentran habitualmente en el derrame pleural son: *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*; *S. aureus*, *H. influenzae*, enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, anaerobios, menos frecuente por actinomicetos, hongos, virus y micoplasmas (García et. al., 1994). Como se puede ver estas bacterias también son en muchos casos responsables de infecciones pulmonares, ya que de este punto es de donde migran al líquido pleural.

D. LÍQUIDO PERICÁRDICO

1. Descripción

El líquido pericárdico normal y trasudado tiene aspecto claro y un color amarillo pálido (Strasinger y Di Lorenzo, 2010). La cavidad pericárdica es el espacio potencial que se encuentra entre las capas opuestas de las capas parietal y visceral del pericardio seroso, normalmente contiene una delgada capa de este líquido seroso (Moore y Agur, 2003).

2. Función

Permite que el corazón se mueva y lata en un movimiento sin fricciones (Moore y Agur, 2003).

3. Volumen normal

Normalmente se encuentra solo un pequeño volumen (10 a 50 mL) (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

4. Obtención

El procedimiento conocido como pericardiocentesis es el procedimiento clásico de drenaje, se debe de realizar siempre en el quirófano. Hasta hace unos años este procedimiento se realizaba con una aguja con una llave de tres pasos, por medio de una jeringuilla de 50 cc. se procedía lentamente a la evacuación, actualmente se dispone con unos sets con los que se cuenta con todo el material desechable para el procedimiento. Lo primero es colocar al paciente en una posición adecuada, elevando el torso 45° para que el líquido quede remansando en la zona diafragmática, el cual será el lugar de la punción, luego de la inserción de la aguja se puede conectar un cable adecuado a una de las derivaciones del ECG, de esta forma se puede ver la imagen electrocardiográfica de un extrasístole cuando la aguja toque el pericardio y evitar herir el corazón (Tamame y Martínez, 2000).

5. Valores Normales

- Glucosa: 75% del valor en suero
- Proteínas: < 3 g/dL

- Eritrocitos: < 100 células / μL
- Leucocitos: < 300 células / μL (Elias, s.f.)

6. Patología

Los derrames pericárdicos son resultado de cambios en la permeabilidad de las membranas debido a infección, procesos malignos o traumatismos productores de exudado. Cuando se sospecha de endocarditis, ésta suele producirse por infecciones respiratorias previas de *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, adenovirus, cocksackievirus, encontrándose en aumento los derrames de origen tuberculoso (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

E. LÍQUIDO SINOVIAL

1. Descripción

También llamado articular, se caracteriza por ser viscoso, debido a la secreción de ácido hialurónico y proteínas por las células que componen la membrana, su composición es muy parecida a la del plasma, a veces es posible observar cristales dentro de él. Se encuentra en las cavidades articulares móviles, los huesos en ellas están revestidas de cartílago articular liso y separados por una cavidad que contiene este líquido. Se forma por ultra filtrado del plasma por la membrana sinovial, aunque ésta no es muy selectiva como en otros líquidos (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

2. Función

En conjunto con el cartílago, reducir la fricción de los huesos durante el movimiento (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

3. Volumen normal

La cantidad de líquido presente varía con el tamaño de la articulación, por ejemplo la cantidad normal de líquido en la cavidad de la rodilla adulta es de 3.5 mL (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

4. Obtención

El líquido sinovial se obtiene por aspiración con aguja estéril, procedimiento conocido como artrocentesis (Strasinger y Di Lorenzo, 2010).

5. Valores Normales

- Glucosa: > 40 mg/dL
- Proteínas: 1.1 – 2.2 d/dL
- Ácido úrico: < 8 mg/dL
- LDH: igual al suero del paciente
- Cristales: Ausencia
- Teste de mucina: no coagula
- Glóbulos blancos: < 100 células / μ L (Líquidos de punción, s.f.)

6. Patología

El agente infeccioso que se encuentra en mayor proporción en las infecciones sinoviales es *S. aureus*, también se encuentran bacterias Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* en pacientes drogadictos por vía intravenosa, inmunocomprometidos, con enfermedades crónicas debilitantes y neonatos (Kelley, 1992).

F. ANÁLISIS DE LOS LÍQUIDOS CORPORALES

Luego de haber obtenido la muestra de los líquidos corporales se procede a realizar el análisis de los mismos, este procedimiento es el mismo para todos los tipos de líquidos:

1. Macroscópico

Primero se realiza una observación macroscópica, de preferencia se debe utilizar un tubo milimetrado para su obtención y así medir el volumen obtenido. De no ser posible se puede utilizar un recipiente similar, se llena con agua hasta el nivel que se obtuvo de muestra, y se mide el agua utilizada. Debido a las características estériles de esta muestra

debe evitarse su contaminación. Se debe anotar la coloración, turbidez, y demás características físicas del líquido a analizar (Silva y García, 2004).

2. Bioquímico

Este ayuda en la clasificación de un trasudado o exudado, sobre todo observar la cantidad de proteínas en él. También se puede hacer un análisis de otros analitos como colesterol, LDH (Lactato deshidrogenasa, triglicéridos, bilirrubina, etc. aunque estos últimos no se realizan de rutina (Strasinger y Di Lorenzo, 2010). En el caso del líquido cefalorraquídeo es de suma importancia de un estudio bioquímico, ya que en la meningitis, especialmente en las bacterianas, se observa una elevación de las proteínas y disminución de la glucosa en una infección bacteriana, mientras que en una infección vírica se pueden encontrar con valores cercanos a los normales (Zaragoza, Gimeno, Pemán y Salavert, 2006).

3. Recuento celular

Se debe realizar un estudio celular básico, empezando con un conteo con una cámara de Neubauer, el mayor aumento celular se ve en las infecciones bacterianas, con un claro predominio de polimorfonucleares. Sin embargo, en infecciones tuberculosas, micótica y víricas existe un aumento de células más moderado y con predominio linfocitario.

La coloración de Gram es la prueba microbiológica más urgente a realizar, especialmente para el LCR, su rendimiento está relacionado con la concentración bacteriana en la muestra y al tipo de microorganismo. También es posible realizar otras tinciones como Ziehl-Neelsen para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes, en concreto *M. tuberculosis*. La tinción de tinta china es muy útil para la detección de levaduras capsuladas (*Cryptococcus neoformans*) (Zaragoza et. al., 2006).

4. Cultivo

Se procede luego al cultivo de la muestra, llevándose a cabo en medios sólidos y líquidos, dentro de los que se incluye el agar chocolate, si se sospecha de una infección por enterobacterias se debe utilizar un medio selectivo diferencial. La incubación se realiza a

37°C con un 5-7% de CO₂ y durante al menos 48 horas (Zaragoza et. al., 2006). En el laboratorio del Hospital General San Juan de Dios se siembra en agar sangre de carnero, agar chocolate y agar MacConkey como rutina.

G. RECUPERACIÓN BACTERIANA

Cómo parte del proceso de análisis realizado a los líquidos corporales se realiza convencionalmente una reconcentración por medio de centrifugación, antes del cultivo, de acuerdo a Forbes, 2009, en el caso del líquido peritoneal se recomienda una lisis celular previo a la centrifugación, lo cual puede incrementar significativamente la detección de microorganismos. La eficacia de la lisis de los leucocitos radica en que un tratamiento con choque osmótico libera los microorganismos presentes en los leucocitos, son liberados de los líquidos de diálisis (Melchor, Sánchez, González y Salazar, 2007).

Existen múltiples técnicas con lo cual se puede lograr dicho procedimiento, usualmente se utiliza para liberar y luego seleccionar los diferentes componentes celulares, el método más liviano y simple para hacerlo es la lisis osmótica que consiste en suspender las células en alguna solución hipotónica, es decir, una solución en la que la concentración de los solutos sea menor a la presente dentro de las células a lisar. Este método funciona bien con células animales, pero suele ser inefectivo en células con pared celular, como las procariontas, por lo que esta técnica es ideal para recuperar bacterias presentes dentro de los fagocitos (Voet y Voet, 2006).

El secuestro de microorganismos patógenos por los leucocitos es común y continuo dentro de los líquidos, especialmente el peritoneal. En este caso, en el momento que un paciente es sometido a diálisis peritoneal, el líquido utilizado para llevar a cabo dicha diálisis puede inhibir las propiedades bactericidas de los leucocitos, reactivándose estas propiedades al inocularse en un medio de cultivo, por lo que las bacterias dentro de ellos mueren y no es posible aislarlas. Debido a ello es necesario recurrir a técnicas en las que se implica la lisis leucocitaria y reconcentración de las bacterias viables. La lisis antes o

después de la inoculación del medio de cultivo, ya sea de forma química o física aumenta notablemente la recuperación de células bacterianas (Taylor, 1994).

Referente a estas técnicas, existe una amplia variedad de opciones, cada una variando en metodología e instrumentos a utilizar. Siendo la más efectiva con un 84%, la centrifugación luego de la lisis leucocitaria, pero es técnicamente demandante. La filtración sin lisis de leucocitos es mucho más simple de realizar y tiene resultados similares. El enriquecimiento de los medios de cultivo es mucho menos satisfactorio, con una efectividad del 65%. El cultivo del líquido luego de realizar una reconcentración por centrifugación es mucho más pobre, con un 59% luego de 48 horas de incubación (Ludlam, Price, Berry & Phillips, 1988).

En la Tabla 3 se encuentran los datos comparativos entre la tinción de Gram y el resultado de los cultivos en el laboratorio del Hospital General San Juan de Dios, durante un periodo de tres meses, tal como se puede notar, en 34 muestras se observan bacterias en la tinción de Gram, pero en el cultivo no se logran aislar. También hay otras discrepancias entre la tinción de gram y el cultivo, ya que no siempre es posible observar bacterias, aunque el crecimiento puede ser positivo cuando se observan leucocitos.

Si se analiza como porcentajes, un 2.97% de muestras mostró bacterias en la tinción de Gram que no fue posible aislar, pero si se toma en cuenta el 23.12% de muestras en la que la presencia de leucocitos en la tinción de Gram no evidenció crecimiento de bacteriano al realizar el cultivo, y un 0.79% de muestras en la que las bacterias observadas no fueron las mismas que las recuperadas en el cultivo, por ejemplo si se observaron cocos gram positivos y la bacteria aislada es un bacilo gram negativo, al incluir todos estos grupos bacterianos el porcentaje se encuentra alrededor del 25%. Tomando en cuenta toda esta información obtenida se puede inferir que la técnica de cultivo utilizada en el área de líquidos del Hospital General San Juan de Dios puede ser mejorada notablemente, disminuyendo la cantidad de falsos negativos.

Tabla 3 Comparación de resultados de tinción de Gram y cultivos

Gram	Cultivo	Cantidad	Porcentaje de muestras
Bacterias	No hay crecimiento	34	2.97%
Leucocitos	No hay crecimiento	264	23.12%
Leucocitos	Crecimiento bacteriano	50	4.38%
Bacterias	Crecimiento bacteriano	24	2.10%
Bacterias	Crecimiento de bacterias distintas	9	0.79%
Negativo	Crecimiento bacteriano	45	3.94%
Negativo	No hay crecimiento	716	62.70%

Fuente: Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios, 2014

H. TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE LISIS CELULAR

1. Citocentrifugación

Utiliza una centrífuga capaz de separar y colocar una capa de 6 mm de células en una placa de vidrio para su tinción con Gram. Esta técnica es útil para mejorar la observación de bacterias, ya que mejora notablemente la observación de las mismas en líquidos corporales, y por ende se acelera el diagnóstico diferencial, debido a un aumento de la sensibilidad del 61 al 89% comparado con la técnica convencional. Los dispositivos utilizados para esta centrifugación deben ser estériles y descartables, sumado al costo elevado de estas centrífugas, vuelve demasiado cara dicha técnica aunque se mejora y acelera el diagnóstico, pero a un costo que no puede ser soportado por el sistema de salud de Guatemala (Díaz, García, De la Barra y Gasep, 2002).

2. Lisis en cultivo

Dentro de las demás técnicas disponibles para el cultivo, se puede utilizar un medio de cultivo que contenga saponinas y demás aditivos para lograr la lisis (Taylor, 1994). Las saponinas son compuestos orgánicos, glucósidos esteroidales ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Las conocidas como saponinas triptenoides se caracterizan por unirse a los colesterol de la membrana celular de los protozoos (eucariotas), lo que ocasiona su ruptura (lisis). La membrana celular de las bacterias no contiene colesterol (Díaz, 2010)

Estos procedimientos y técnicas son conocidos dentro del hospital como Isolator®, son utilizados para la recuperación de bacterias y hongos intracelulares, también para bacterias anaeróbicas en hemocultivos, ya que las saponinas tampoco afectan a estos microorganismos, pero se pueden usar con líquidos corporales. La desventaja de la utilización de este tipo de sustancias es el costo aumentado de los medios de cultivo (Pemán, Ramos e Iglesias, 2011).

3. Soluciones lisantes

Otras soluciones que se utilizan para provocar lisis leucocitaria son formuladas dependiendo de la metodología, así algunas contienen enzimas, emulsificantes como Tween 20, etc. se aplican no sólo para líquidos corporales sino que principalmente en hemocultivos, en cuyo caso se agregan soluciones lisantes como polietanolsulfonato a los caldos de cultivo, obteniendo un 50% de cultivos positivos contra un 25% de cultivos positivos con la metodología convencional. A pesar de esta notoria ventaja, demostrada en hemocultivos, la adición de cada una de estas sustancias implica un aumento en el costo de estos medios de cultivo (Zierdt, Peterson, Swan & MacLowry, 1982).

4. Filtración

Es una técnica mucho más compleja, adicional a la lisis celular se filtran las muestras en una membrana de celulosa, usualmente con poros de 0.45 µm o menos. Luego estas membranas son cultivadas de nuevo en un medio nutritivo para proseguir con la identificación de las bacterias. Se ha podido observar un incremento de la sensibilidad de esta metodología, conforme la bacteriemia se va volviendo indetectable. Debido a que regularmente se encuentra una cantidad muy baja de bacterias, la detección por cultivo es muy rara debido a la fagocitosis, por lo que la metodología de choque osmótico vuelve mucho más sensible el cultivo. Evidentemente la desventaja de esta metodología radica en la necesidad de una membrana para la filtración, y un nuevo medio de cultivo para la identificación de las bacterias, a pesar de ser la técnica con una mayor recuperación bacteriana, no ha podido desplazar al cultivo convencional, o al adicionado únicamente con sustancias lisantes (Zierdt et al., 1982).

IV. JUSTIFICACIÓN

La técnica utilizada dentro del laboratorio del Hospital General San Juan de Dios es la reconcentración por centrifugación, la cual cuenta con un 59% de recuperación luego de 48 horas de incubación (Ludlam et al., 1988) se podría inferir que alrededor del 40% de los pacientes tiene un resultado falso negativo, tomando en cuenta esta información es necesario realizar una mejora en la recuperación de bacterias dentro de los líquidos corporales. Con la aplicación de la técnica de choque osmótico se podrá reducir el número de resultados falsos negativos, evitando que verdaderas infecciones que requieren un tratamiento médico sean tomadas como procesos inflamatorios no infecciosos, y reduciendo la toma de muestras repetidas, ya que son procesos poco agradables para los pacientes. También tomando en cuenta que no hay estudios de este tipo, siendo este el primero en realizarse.

Conociendo las limitantes de recursos dentro del hospital, es necesario optar por la variante que sea más accesible y simple, el “choque osmótico, sin necesidad de recursos extras a los disponibles en el laboratorio, que ha demostrado ser bastante efectiva para provocar lisis leucocitaria (Melchor et. al., 2007). También se optó por la solución más accesible, la cual es solución salina hipotónica a distintas concentraciones, para determinar la mejor dilución a utilizar en el análisis de líquidos de esta unidad, todo esto con el fin de mejorar el proceso sin necesidad de realizar muchos cambios en mismo, evitando utilizar materiales o equipos extra a los ya utilizados, logrando así mayor eficacia, razones por las cuales es importante realizar este estudio.

Finalmente, reiterando la aplicación de la técnica por choque osmótico, la utilización de solución salina hipotónica como pretratamiento no encarece la prueba convencional, y su posterior proceso no difiere tampoco, por lo que no es necesario invertir en equipo, o materiales extras, logrando una técnica barata y fácilmente aplicable en cualquier laboratorio que actualmente cuente con análisis y cultivo de líquidos corporales.

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de la recuperación de bacterias en fagocitos a través de lisis celular utilizando la técnica de choque osmótico.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la concentración de solución salina hipotónica que permita la mayor recuperación de bacterias dentro de fagocitos.
- Comparar por medio del cultivo la recuperación de bacterias dentro de fagocitos en diferentes líquidos corporales con respecto a la técnica convencional.

VI. HIPÓTESIS

La lisis a células fagocíticas presentes en los líquidos corporales por choque osmótico con solución salina hipotónica mejora la recuperación de bacterias viables fagocitadas, permitiendo obtener resultados positivos e identificación del agente etiológico de infecciones no detectadas por la metodología convencional.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO Y MUESTRA

1. Universo

La población que acude al Hospital General San Juan al Laboratorio Clínico para realizar un análisis de algún líquido corporal: peritoneal, sinovial, pericárdico, cefalorraquídeo o pleural, efectuándose los análisis de macroscópicos, citológicos, bioquímicos y microbiológicos de rutina.

2. Muestra

La muestra fue seleccionada por conveniencia en un periodo de tres meses. Es un estudio de tipo transversal. De 468 muestras se incluyeron en el estudio 114 de líquidos peritoneales, sinoviales, cefalorraquídeos, pericárdicos, o pleurales, que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Conteo: ≥ 5 leucocitos/mm³.
- Volumen de muestra: ≥ 500 μ L.

Todas las muestras que no cumplieron con los criterios anteriores fueron excluidas del estudio. También se excluyeron los líquidos seminales y amnióticos, debido a que no se les realiza cultivo de rutina en el laboratorio del Hospital General San Juan de Dios.

B. RECURSOS

1. Humanos

a. Tesista:

- Br. Diego Monterroso Rodríguez.

b. Asesores:

- MSc. Martin Nestor Gil Carrera.
- Lic. Antonio Alejandro Galindo Ruiz

2. Institucionales

Laboratorio de Líquidos Corporales, Laboratorio Clínico, Hospital General San Juan de Dios.

C. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

- Microtubos de 2.0 mL
- Láminas portaobjetos de vidrio
- Cubreobjetos de vidrio
- Cámara de Neubauer
- Pipetas plásticas desechables
- Asas bacteriológicas

2. Equipo

- Centrífuga para microtubos
- Campana de flujo laminar
- Microscopio de luz
- Incubadora a 37° C

3. Reactivos

- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol-acetona
- Safranina
- Tinta china
- Carbol fucsina
- Alcohol-ácido
- Azul de metileno
- Solución salina al 0.6 %

- Solución salina al 0.3 %
- Solución salina al 0.1 %
- Agua destilada estéril

4. Medios de cultivo

- Agar sangre de carnero al 5%
- Agar chocolate
- Agar MacConkey

5. Procedimiento

El personal del Laboratorio del Hospital General San Juan de Dios realizó el procedimiento estándar establecido para el análisis de líquido el cual incluye concentración por centrifugación, adicionándole un tratamiento con soluciones hipotónicas previo a la inoculación de los medios de cultivo, los dos descritos a continuación:

a. Procedimiento estándar

i. Evaluación macroscópica

Se evaluó la muestra al ser entregada al servicio, se observó su color, consistencia, xantocromía y turbidez.

ii. Centrifugación

Se colocó la muestra en un micro tubo y se centrifuga a 3000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizaron los siguientes procedimientos con el sedimento.

iii. Evaluación microscópica

- Recuento celular en cámara de Neubauer
 - Se colocó una gota (aproximadamente 20 μ L) del líquido en la cámara directamente.
 - Se contó en los cuatro cuadrantes de blancos.
 - El resultado del conteo se multiplicó por el factor de 2.5.

- Preparación con tinta china
 - Se colocó una gota de tinta china y una gota del líquido a analizar
 - Se buscaron levaduras encapsuladas al microscopio en aumento 40x.

- Tinción de Gram
 - Luego de fijar el frote con calor se cubrió con cristal violeta durante un minuto.
 - Se enjuagó con agua la laminilla.
 - Se cubrió con solución de lugol por un minuto.
 - Se enjuagó con agua la laminilla
 - Se lavó el frote con dos a tres gotas de alcohol-acetona
 - Se enjuagó con agua la laminilla
 - Se cubrió a lámina con safranina por un minuto.
 - Se enjuagó con agua la laminilla
 - Se dejó secar
 - Se observó al microscopio con el objetivo 100x.

- Tinción de Ziehl-Neelsen
 - Luego de fijar el frote por calor se cubrió con carbol-fucsina y un trozo de papel filtro que cubrió la muestra
 - Se calentó hasta que se observe emisión de vapores
 - Se enjuagó con agua la laminilla
 - Se lavó el frote con alcohol-ácido
 - Se enjuagó con agua la laminilla
 - Se cubrió el frote de nuevo con azul de metileno por 30 segundos.
 - Se enjuagó con agua la laminilla
 - Se observó al microscopio con el objetivo 100x.

iv. Cultivo

- Inóculo
 - Se tomó una asada con un asa bacteriológica en argolla y se inocularon los medios de cultivo: Agar sangre de carnero, agar chocolate y agar MacConkey
- Rayado estandarizado
 - Luego de realizar el inóculo inicial se flameó el asa para poder esterilizarla
 - Se procedió a hacer un segundo grupo de líneas iniciando en el inóculo inicial.
 - Se flameó de nuevo.
 - Se repitió iniciando en las últimas líneas dibujadas.
 - Se hizo una línea en ondas luego de flamear en la cual se encontrarían colonias aisladas;
 - Luego de esto se procedió a incubar a 35°C por 24 a 48 horas en una incubadora sin ningún tipo de enriquecimiento en CO₂.

b. Procedimiento de choque osmótico

i. Selección de la muestra

Se seleccionaron aquellas muestras que contaban con un conteo de al menos 5 leucocitos/mm³ y con un volumen de al menos 500 µL, luego de realizar el procedimiento de rutina. El número de muestra fue por conveniencia en un periodo de tres meses, logrando analizar 114 muestras.

- Choque osmótico
 - Se tomaron alícuotas de 100 µL del líquido.
 - Se agregaron 100 µL de solución salina hipotónica a las diferentes concentraciones, 0.6%, 0.3%, 0.1% y agua destilada estéril.
 - Se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto, durante 10 minutos.
 - Se realizó un nuevo conteo citológico para verificar la efectividad de la lisis celular.

- Se inocularon los medios de cultivo convencionales, Agar sangre de carnero, chocolate y MacConkey, y se incubó a 35°C por 24 a 48 horas.
- Evaluación del procedimiento
 - Se comparó el crecimiento y aislamiento para la misma muestra.
 - Se cotejó el número de cultivos positivos y negativos a cada concentración, confrontándolo con la metodología convencional.
 - Se utilizó el test Q de Cochran se podrá comprobar la efectividad de cada una de las soluciones, determinando así la solución idónea para utilizar dentro del laboratorio.
 - Se tomó en cuenta la tinción de Gram, ya que la observación de bacterias en dicha tinción sugiere una infección, pero debe ser identificado por medio de cultivo.

D. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Tipo de estudio

Estudio experimental aleatorizado

2. Variables

a. Independientes

Las cuatro distintas concentraciones de la solución hipotónica: 0.6%, 0.3%, 0.1% y agua destilada estéril.

b. Dependientes

Cultivos positivos y negativos en cada concentración.

3. Validez de los métodos

El método de rutina se comparó con el método de choque osmótico, el cual fue basado en el procedimiento de Melchor, 2007, modificado al utilizar distintas concentraciones para evaluar la efectividad de las mismas.

4. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando el Test Q de Cochran, con el cual se verifica si distintos tratamientos tienen efectos comparables, cuando sólo puede haber dos resultados, en este caso, positivo y negativo (Conover, 2006). Estos resultados se codificaron como 0 y 1, esta prueba asume que hay más de dos tratamientos experimentales ($c \geq 2$), y las observaciones son arregladas en r bloques, de la siguiente manera:

Block	Tratamiento			
	1	2	...	C
1	X_{11}	X_{12}	...	X_{1c}
2	X_{21}	X_{22}	...	X_{2c}
3	X_{31}	X_{32}	...	X_{3c}
...
r	X_{r1}	X_{r2}	...	X_{rc}

Luego de realizadas las observaciones se procedió a tabular los resultados, indicando con un 0 un resultado negativo y con un 1 un resultado positivo, para proceder con el análisis por medio de la prueba Q de Cochran, donde k es el número de tratamientos, n es el número de bloques o muestras, los grados de libertad son $k-1$, el valor de α es de 0.05 siempre, el valor de Q se calculó usando la fórmula de Cochran, tomando en cuenta los grados de libertad se utilizó la fórmula de χ^2 (chi cuadrado) para obtener la probabilidad “p”, el valor de Q-crítico se utilizó el valor de χ^2 inverso, para finalizar si el valor de Q-crítico es menor a “p” se acepta la H_a , en caso contrario es la H_0 siendo estas:

- H_a : Al menos unos de los tratamientos es más efectivo en la recuperación bacteriana.
- H_0 : Todos los tratamientos son igual de efectivos para la recuperación bacteriana.

Como resultado se puede comprobar o rechazar completamente una hipótesis dependiendo si están en el área crítica (NIST, s.f.).

Cuando la hipótesis nula es rechazada, se puede realizar una prueba Q de Cochran, la cual sería equivalente a la prueba de McNemar, para identificar exactamente dónde hay una diferencia (Zaiontz, 2013) En este caso se realizó una prueba de McNemar, esta se utiliza para decidir si puede o no aceptarse que algún tratamiento induce un cambio en la respuesta de los elementos sometidos al mismo, aplicable a modelos “antes – después” en los que cada elemento actúa como su propio control (Guzmán, 2017).

Se clasifican con número de 0 y 1, con el mismo formato ya utilizado, y los resultados se representan en una tabla 2 x 2 en la siguiente forma:

		Clasificación Y_i	
		(+) $Y_i = 0$	(-) $Y_i = 0$
Clasificación X_i	(+) $X_i = 0$	A (0,0)	B (0,1)
	(-) $X_i = 1$	C (1,0)	D (1,1)

El análisis se puede realizar de dos maneras, siendo $B+C = n$:

1. Si $n < 20$ la estadística de contraste es: $T_1 = B$

Para esta estadística rechazamos H_0 si:

$$T_1 \geq \chi^2_{\alpha/2} (1 \text{ g.l.})$$

$$T_1 \leq \chi^2_{1 - \alpha/2} (1 \text{ g.l.})$$

2. Si $n \geq 20$ entonces la estadística de contraste es:

$$T_1 = (B - C)^2 / (B + C) \approx \chi^2$$

Para esta estadística rechazamos H_0 si:

$$T_1 \geq \chi^2_{\alpha/2} (1 \text{ g.l.})$$

$$T_1 \leq \chi^2_{1 - \alpha/2} (1 \text{ g.l.})$$

(Guzmán, 2017)

VIII. RESULTADOS

De 468 muestras de líquidos peritoneales, sinoviales, cefalorraquídeos, pericárdicos, o pleurales, analizadas, se incluyeron en el estudio 114 que cumplieron con los criterios de inclusión. La distribución por tipo de muestra se observa en la Tabla 1, indicando el número de muestras para cada tipo de líquido. El líquido que predomina fue el líquido peritoneal con 67.54 % (n= 77), seguido por el cefalorraquídeo con 23.68% (n=27), los demás líquidos tienen una menor cantidad de muestras.

Tabla 1. Muestras analizadas por tipo de líquido

Tipo de líquido	Número	Porcentaje (%)
Peritoneal	77	67.54
Cefalorraquídeo	27	23.68
Pleural	6	5.26
Cardiaco	2	1.75
Sinovial	2	1.75

Fuente: Datos experimentales

En la Tabla 2 se puede observar el porcentaje de muestras positivas para el método de referencia y comparándolas con el método de choque osmótico con cada una de las soluciones hipotónicas utilizadas. Tal como se puede observar el porcentaje de resultados positivos aumentó de 9.65% (n=11) con el método de referencia, hasta un 16.67% (n=19) con agua destilada y solución salina al 0.1%. Utilizando las concentraciones de solución salina al 0.6% y 0.3% el porcentajes de recuperación es menor, 14.91% (n=17) y 15.79 % (n=18) respectivamente.

Tabla 2. Cultivos positivos en los líquidos corporales del estudio

Método	Número de cultivos positivos	Porcentaje de cultivos positivos
Referencia	11	9.65
NaCl 0.6 %	17	14.91
NaCl 0.3 %	18	15.79
NaCl 0.1 %	19	16.67
H ₂ O destilada	19	16.67

Fuente: Datos experimentales, NaCl: Cloruro de sodio

En la Tabla 3 se detalla la cantidad de muestras positivas únicamente para los líquidos peritoneales, con el método de referencia hay un porcentaje de 11.69 % (n=9) de cultivos positivos, el comportamiento con estas muestras es muy parecido al general de las muestras incluidas en este estudio, la mayor recuperación se obtiene con el agua destilada y la solución salina al 0.1 %, aumentado a 18.18 % (n=14) en ambos casos, con la solución salina al 0.3% se mejora a 16.88 % (n=13) y con la concentración a 0.6% llega hasta 15.58 % (n=12).

Tabla 3 Cultivos positivos para líquido peritoneal

Método	Número de cultivos positivos	Porcentaje de cultivos positivos
Referencia	9	11.69
NaCl 0.6 %	12	15.58
NaCl 0.3 %	13	16.88
NaCl 0.1 %	14	18.18
H ₂ O destilada	14	18.18

Fuente: Datos experimentales, NaCl: Cloruro de sodio

El segundo líquido con mayor cantidad de muestras fue el cefalorraquídeo (Tabla 1), por lo que se decidió hacer el análisis del cambio en el porcentaje de cultivos positivos con estas muestras también, el cual se puede observar en la Tabla 4, en este caso el método de referencia tiene un porcentaje de cultivos positivos de 3.70 % (n=1) y con todas las soluciones hipotónicas aumenta a 14.81 % (n=4). No se realizó este análisis con los demás tipos de líquidos por ser la cantidad de muestras muy reducida.

Tabla 4 Porcentaje de cultivos positivos para líquido cefalorraquídeo

Método	Número de cultivos positivos	Porcentaje de cultivos positivos
Referencia	1	3.70
NaCl 0.6 %	4	14.81
NaCl 0.3 %	4	14.81
NaCl 0.1 %	4	14.81
H ₂ O destilada	4	14.81

Fuente: Datos experimentales

La Tabla 5 muestra los diferentes microorganismos aislados luego del tratamiento por choque osmótico y el tipo de muestras de las que fueron aisladas, estas muestras originalmente fueron negativas con la metodología convencional, se puede observar que la mayoría se aislaron de líquidos peritoneales, con únicamente tres líquidos cefalorraquídeos.

Tabla 5. Microorganismos aislados en muestras originalmente negativas por la metodología convencional

Microorganismo	Número de muestras	Tipo de líquido
Bacterias gram negativo		
Bacilo gram negativo no fermentador	2	Peritoneal
<i>Citrobacter</i> sp.	1	Peritoneal
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	Peritoneal
<i>Escherichia coli</i>	1	Cefalorraquídeo
Bacterias gram positivo		
<i>Enterococcus faecium</i>	1	Peritoneal
<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo	1	Peritoneal
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	Cefalorraquídeo
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	Peritoneal
Hongos		
Levaduras sin identificación	1	Peritoneal

Fuente: Datos experimentales

El análisis realizados con la prueba Q de Cochran se encuentra en la Tabla 6, de primero se encuentra el análisis aplicado a todos los líquidos corporales, luego únicamente el análisis de los líquidos peritoneales y por último los cefalorraquídeos. Analizando los cinco tratamientos, las 114 muestras totales, 77 de peritoneales y 27 cefalorraquídeos, se utilizan 4 grados de libertad, con un α de 0.05, es decir un grado de confianza del 95%.

Se calculó el valor Q siendo 22.4 para todos los líquidos, 12.4 para los peritoneales y 12 para los cefalorraquídeos, de este se calculó el valor de la probabilidad o “p”, siendo 0.000167 para todos los líquidos, 0.015348 para los peritoneales y 0.017351 para los cefalorraquídeos. El valor de Q-crítico se calculó usando α y los grados de libertad, obteniendo un valor de 9.487729. Debido a que el valor “p” es muy pequeño comparado con el valor de Q-crítico, se valida H_0 considerándose todos los tratamientos igual de efectivos estadísticamente en todos los casos analizados

Tabla 6. Comparación de los distintos tratamientos con prueba Q de Cochran.

Análisis Q de Cochran	Líquidos corporales	Líquido peritoneal	Líquido cefalorraquídeo
Tratamientos (k)	5	5	5
Muestras (n)	114	77	27
Grados de libertad	4	4	4
α	0.05	0.05	0.05
Valor Q	22.4	12.3	12
Probabilidad (p)	0.000167	0.015348	0.017351
Valor Q-crítico	9.487729	9.487729	9.487729
Hipótesis aceptada	H_0	H_0	H_0

Fuente: Datos experimentales

Se observa en la Tabla 7 los resultados de la prueba de McNemar obtenidos luego de comparar cada una de las soluciones hipotónicas con el método de cultivo de referencia. El primero que se obtiene el valor de $B + C$, al ser menor a 20 se utiliza B como T_1 ,

utilizando esto se puede calcular el valor de la probabilidad o “p”, también el valor de $\chi^2_{\alpha/2}$ (1 g.l.).

En todos los casos el valor de T_1 es menor a χ^2 , por lo que se acepta la hipótesis nula, determinando que todos los tratamientos son igual de efectivos que el método de referencia desde el punto de vista estadístico.

Tabla 7. Comparación de los distintos tratamientos con prueba de McNemar

	H ₂ O destilada	NaCl 0.1 %	NaCl 0.3 %	NaCl ¹ 0.6 %
B+C	8	8	7	6
T ₁	0	0	0	0
p	6.09 x 10 ⁻¹⁵	6.09 x 10 ⁻¹⁵	7.75 x 10 ⁻¹⁶	7.77 x 10 ⁻¹⁶
α	0.05	0.05	0.05	0.05
$\chi^2_{\alpha/2}$ (1 g.l.)	0.000982069	0.000982069	0.000982069	0.000982069
Hipótesis aceptada	H ₀	H ₀	H ₀	H ₀

Fuente: Datos experimentales

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla 1 es posible apreciar que la mayor cantidad de muestras son los líquidos peritoneales, siendo más de la mitad de la población (67.54 %), ésto se debe a la distribución normal de los líquidos en el Hospital, también por ser las muestras que normalmente cuentan con mayor volumen, por lo que fue más probable que cumplieran con los criterios de inclusión, los demás líquidos muchas veces no cumplían con la cantidad de volumen necesario para realizar el análisis, haciendo que fueran rechazadas, reduciendo la cantidad de muestras incluidas en el estudio.

En la Tabla 2 fue posible observar que el pretratamiento con choque osmótico logró aumentar la recuperación bacteriana desde un 9.65% hasta 16.67% con dos de las soluciones hipotónicas utilizadas (solución salina al 0.1% y agua destilada estéril) y se observó un aumento menor en las otras dos (solución salina al 0.3 y 0.6%). Lo anterior se debe a la baja osmolaridad de las dos primeras soluciones, lo que propiciaron una lisis mucho más efectiva de las células fagocíticas, mientras que los microorganismos por su capacidad de soportar ambientes más inhóspitos sobrevivieron y pudieron ser aislados e identificados por medio del cultivo.

Debido a que el estudio original realizado por Melchor et. al., 2007 fue diseñado originalmente con líquidos peritoneales, fue el tipo de muestras con mayor número acorde a la Tabla 1, y la mayoría de microorganismos recuperados se encontraban en éstos líquidos; por ello se calculó de nuevo el porcentaje de líquidos positivos con cada uno de los métodos utilizados, encontrándose en la Tabla 3 un comportamiento similar a los resultados de la Tabla 1, siendo las mismas dos soluciones (solución salina al 0.1% y agua destilada estéril) las más efectivas en aumentar el número de cultivos positivos.

En la Tabla 4 se observa el análisis de los líquidos cefalorraquídeos, en este caso todas las soluciones pudieron aumentar la recuperación bacteriana en la misma medida. Se

puede indicar que las soluciones idóneas para la recuperación de bacterias fagocitadas por medio de choque osmótico son el agua destilada, y la solución salina al 0.1%.

En la Tabla 5 se detallan las diferentes especies de microorganismos aislados, obteniendo una amplia variedad que abarca la mayoría de los tipos de patógenos que pueden generar una infección en este tipo de muestras. Los dos bacilos Gram negativo no fermentadores, la bacteria del género *Citrobacter*, la bacteria identificada como *Pseudomonas* sp., y las levaduras reportadas sin identificación, que usualmente se identifican por el método API, no pudieron ser identificadas debido a la falta de insumos en el Hospital General San Juan de Dios, por el desabastecimiento del sistema nacional de salud.

Se identificó también una bacteria de la especie *Escherichia coli*, la cual es la especie de bacteria recuperada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que afectan casi a cualquier tejido y sistema orgánico humano. (Konemann, Allen, Winn, Janda, Procop, Schreckenberger, et. al., 2008). En este caso se aisló de un líquido cefalorraquídeo donde se conoce por generar meningitis sobre todo en recién nacidos, acorde a Konemann, 2008.

Fue posible identificar a tres especies de *Staphylococcus*, una de ellas como coagulasa negativo, éstas son consideradas como contaminantes con escasa importancia clínica, dentro del protocolo del Hospital General San Juan de Dios no se avanza en su identificación. La especie de *S. saprophyticus* fue identificada dos veces, se clasifica también dentro de los coagulasa negativo. (Konemann, et. al., 2008). Por último se identificó una cepa de *Streptococcus agalactiae*.

A pesar de que algunos microorganismos son parte de la microbiota normal de un ser humano, la mayoría no se encuentran normalmente en superficies y es probable que estuviera generando una patología en el paciente del cual se obtuvo la muestra. Cabe hacer notar que, debido a las características del procedimiento, el tratamiento por choque osmótico se realizó luego de realizar el análisis y cultivo convencional, por lo que las muestras ya estaban manipuladas por el personal hospitalario. Es factible que algunos de

los microorganismos aislados sean por contaminación, aún así, el número de muestras completamente negativas es muy alta, indicando un buen procedimiento y manipulación de las muestras. Para poder eliminar esta incertidumbre al realizar un estudio del mismo tipo es recomendable efectuar el procedimiento alterno al mismo tiempo, para asegurar la integridad de la muestra.

A pesar de que efectivamente se observó una mejora en la recuperación bacteriana fue necesario realizar un análisis por el método Q de Cochran, cuyos resultados se encuentran en la Tabla 6, para comprobar si esta diferencia es estadísticamente significativa, es decir que se descarte que la diferencia sea por el nuevo método utilizado y no por la diferencia en el tiempo en que se procesaron las muestras, o algún tipo de contaminación aleatoria. Con ésta prueba se determinó que la diferencia entre estos tratamientos no es significativa estadísticamente. Tomando en cuenta estos datos se podría inferir que el tratamiento con choque osmótico si mejora la recuperación de microorganismos en los líquidos corporales, pero esta diferencia no es lo suficientemente grande para sustentar su aplicación en la rutina del Hospital General San Juan de Dios.

Debido a que la prueba Q de Cochran se ve afectada por la cantidad de muestras utilizadas y la cantidad de tratamientos analizados, se repitió de nuevo el análisis utilizando únicamente las muestras de líquido peritoneal, y de líquido cefalorraquídeo, lo que se encuentra a detalle también en la Tabla 6. Se determinó que esta diferencia tampoco es significativa, invalidando la hipótesis de la misma manera, a pesar de contar con una diferencia en la cantidad de resultados positivos.

Para determinar si esta diferencia se debía a la homogeneidad de los resultados con las diferentes soluciones hipotónicas se llevó a cabo el análisis de MacNemar, con el cual se puede analizar la diferencia entre el método de referencia y las diferentes soluciones hipotónicas individualmente, vemos que la hipótesis nula es la aceptada en todos los casos, es decir que no hay diferencia estadística significativa que pueda respaldar el uso de ninguna de estas soluciones para mejorar la recuperación bacteriana en el cultivo de líquidos corporales.

Si se desea repetir este estudio se puede seleccionar sólo una de las soluciones más efectivas durante un periodo de tiempo mucho más largo, ya que ello optimizará los recursos utilizados, el tiempo utilizado en el análisis de cada muestra, y se podrá abarcar una cantidad mayor de especímenes; también se recomienda realizar los dos procedimientos en paralelo para eliminar la probabilidad de contaminación de la muestra por la diferencia en el tiempo que se han realizado los dos procedimientos.

X. CONCLUSIONES

- El método de choque osmótico es eficaz para mejorar la recuperación de bacterias en fagocitos ya que la recuperación de bacterias en fagocitos se mejoró del 9.65% con el método convencional al 16.67% con el método de choque osmótico.
- La solución salina al 0.1% y el agua destilada estéril son las soluciones más efectivas para la recuperación de bacterias fagocitadas
- En líquido peritoneal se aumentó la recuperación de bacterias en los cultivos de un 11.69% a un 18.18%
- En líquido cefalorraquídeo se aumentó la recuperación de bacterias en los cultivos de un 3.70% a un 14.81%
- No hay diferencia estadística significativa entre las soluciones hipotónicas y el método de referencia.

XI. RECOMENDACIONES

- Repetir este estudio utilizando sólo una de las soluciones hipotónicas más efectivas durante un periodo de tiempo más largo, para optimizar recursos, reducir el tiempo de análisis por muestra y abarcar un número mayor de especímenes.
- Realizar el choque osmótico al mismo tiempo que el cultivo de referencia para manipular al mínimo las muestras y eliminar cualquier posible sesgo por contaminación.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anzolane, L., Arenas, C., Ballasté, R., Bazet, C., Blanco, J., Legnani, M.,... Seije, V. (2004) *Manual de toma de muestra para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico*. Uruguay: Departamento de laboratorio clínico repartición microbiología, Hospital de Clínicas Facultad de Medicina
- Arias, J., Aller, M., Arias, J. y Aldamendi I. (2000). *Enfermería Médico-Quirúrgica: I*. Madrid: Editorial Tébar.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (2016) *Meningitis bacteriana*. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/meningitis/bacterial-sp.html>
- Conover, W. (2006). *Practical Nonparametric Statistics* (3a ed.) Nueva York: Wiley & Sons, Inc.
- Díaz, G. (2010). *Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia*. Bogotá: Editorial Universidad Nacional de Colombia.
- Díaz, J., Fernández, M. y Parede, F. (1997). *Aspectos básicos de bioquímica clínica*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Díaz, J., García, P., De la Barra, P. y Gasep, J. (2002). Utilidad de la centrifugación en el diagnóstico bacteriológico microscópico de fluidos corporales. *Revista Chilena de Infectología*, 19(3), 167-173.
- Elias, C. (s.f.) *Laboratorio de análisis clínicos*. Recuperado de: http://laboratorio.draclaudiaelias.com.ar/determinaciones/liquididos_puncion.htm

- Forbes, B., Sahn, D. y Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico* (12a ed.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- García P., Fernández M. y Paredes F. (1994) *Microbiología Clínica Aplicada* (2a ed.) Cádiz: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz.
- Guzmán R. (2017) *Prueba de McNemar*. Recuperado de: <http://doc.shf.gob.mx/estadisticas/IndiceSHFPreciosViv/Documents/ukguyjg.pdf>
- Huamán, M. (s.f.) *Peritonitis*. Recuperado de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/libros/medicina/cirugia/tomo_i/cap_12_peritonitis.htm
- Kam-Tao, P., Szeto, C., Piraino, B., Bernardini, J., Figuereido, A., Gupta, A.,... Strujik, D. (2010). Peritoneal Dialysis-Related Infections Recommendations, 2010-Update. *Peritoneal Dialysis International*, 30, 393-423.
- Kelley, W. (1992). *Medicina Interna* (2a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Koneman, E., Allen, S., Winn, W., Janda, W., Procop, C., Schreckenberger, P., et. al. (2008) *Diagnóstico microbiológico*. (6a ed.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Liem, T. (2006). *La osteopatía craneosacra*. Badalon: Editorial Paidotribo
- Líquido Cefalorraquídeo (LCR) (s.f) *Valores normales*. Recuperado de: <http://www.valoresnormales.com/valores-agrupados/liquido-cefalorraquideo-lcr>
- Líquidos de punción (s.f.) *Estudio del líquido sinovial*. Recuperado de: <http://biodiagnostics.com.mx/277-p.php>

- Ludlam, H., Price, T., Berry, A. & Phillips, I. (1988). Laboratory diagnosis of peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(9), 1757-1762
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. y Roitt, I (2007). *Inmunología* (7a ed.) España: Editorial Elsevier.
- Anzolane, L., Arenas, C., Ballasté, R., Bazet, C., Blanco, J., Legnani, M.,... Seije, V. (2004) *Manual de toma de muestra para estudio bacteriológico, parasitológico y micológico*. Uruguay: Departamento de laboratorio clínico repartición microbiología, Hospital de Clínicas Facultad de Medicina
- Melchor, C., Sánchez, I., González, M. y Salazar, J. (2007). Choque osmótico de células de líquido peritoneal para el diagnóstico de infección peritoneal en pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria (DPCA) *Bioquímica*, 32, 139.
- Montenegro, J., Correa, R. y Riella, M. (2009) *Tratado de diálisis peritoneal*. Barcelona: Editorial Elsevier.
- Moore, K. y Agur, A. (2003). *Fundamentos de anatomía con orientación clínica* (2a ed.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- NIST National Institute of Standards and Technology (s.f.). *Cochran Test*. Recuperado de: <http://www.itl.nist.gov/div898/software/dataplot/refman1/auxillar/cochran.htm>
- Padrós, G., Galán, A., Guillén, E., Hortas, M., Marín, J.... Noguera, A. (2004). Recomendaciones para el estudio del líquido sinovial. *Química Clínica*, 23(6), 434-438.
- Pagana, K. y Pagana, T. (2014) *Laboratorio clínico, indicaciones e interpretación de resultados*. (5ta. Ed.) México D.F.: Editorial el Manual Moderno.

- Pemán, J., Ramos, P. e Iglesias, I. (2011). Procesamiento de las muestras de sangre, líquidos estériles y tejidos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 6, 1-8
- Rivas, R. y Sánchez, M. (2006). Diálisis peritoneal. En: Tratado de enfermería en cuidados críticos pediátricos y neonatales. Recuperado de: <http://www.eccpn.aibarra.org/temario/seccion9/capitulo143/capitulo143.htm>
- Rivera, C., Martínez, G., Melini, G. y Cabrera, A. (2011) *Prevalencia de Meningitis en Pacientes Pediátricos y Adultos del Hospital General San Juan de Dios de Guatemala*. (Tesis de licenciatura inédita) Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Rojo, J. y Barbera, J. (1992). *Lecciones de neurocirugía*. (3a ed.). Oviedo: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo.
- Ronco, C., Rosner, M. & Crepaldi, C. (2012). *Peritoneal dialysis state-of-the-art*. Basel: Editorial Karger.
- Silva, M. y García, M. (2004). *Manual del Técnico Superior de Laboratorio de Análisis Clínicos*. Sevilla: Editorial MAD, S.L.
- Silva, M., García, M., Gómez, D., Muñoz, D., Silva, L... De Torres, A. (2006). *Técnico Especialista en Laboratorio del Servicio Gallego de Salud*. Sevilla: Editorial MAD, S.L.
- Strasinger, S. y Di Lorenzo, S. (2010). *Análisis de Orina y Líquidos Corporales* (5a ed.) Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Tamame, S. y Martínez, C. (2000) *Cirugía, aparato digestivo, aparato circulatorio, aparato respiratorio*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Taylor, P. (1994). Routine Laboratory diagnosis of continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis using centrifugation/lysis and saponin-containing media *European Journal Of Clinical Microbiology Infections and Disease*, 13, 249-252.

Voet, D. y Voet, J. (2006). *Bioquímica*. (3a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Zaiontz, C. (2013) *Real statics using Excel, Cochran's Q Test*. Recuperado de: <http://www.real-statistics.com/anova-repeated-measures/cochrans-q-test/>

Zaragoza, R., Gimeno, C., Pemán, J. y Salavert, M. (2006). *Microbiología Aplicada al Paciente Crítico*. (3a ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Zierdt, C., Peterson, D., Swan, J. & MacLowry, J. (1982). Lysis-filtration blood culture versus conventional blood culture in a bacteremic Rabbit Model. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(1), 74-77.



Br. Diego Monterroso Rodríguez

AUTOR



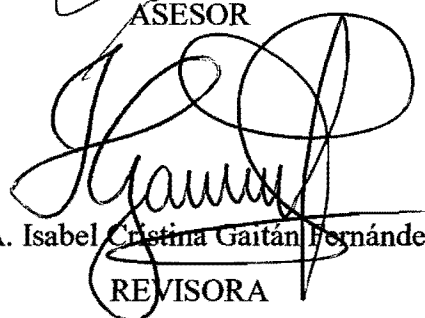
M. Sc. Martín Nestor Gil Carrera

ASESOR



Lic. Antonio Alejandro Galindo Ruiz

ASESOR



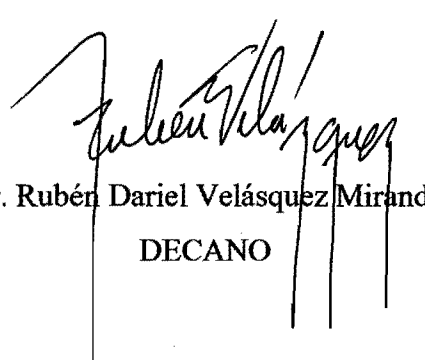
M. A. Isabel Cristina Gaitán Fernández

REVISORA



M. Sc. Alba Marina Valdés de García

DIRECTORA DE ESCUELA



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

DECANO