



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

SENSIBILIDAD DE LA TINCIÓN DE GRAM EN LÍQUIDO  
CEFALORRAQUÍDEO PARA EL DIAGNÓSTICO DE MENINGITIS  
BACTERIANA, ECUADOR.2020

SARANGO YUNGA EILEEN CAROLINA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2020



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

SENSIBILIDAD DE LA TINCIÓN DE GRAM EN LÍQUIDO  
CEFALORRAQUÍDEO PARA EL DIAGNÓSTICO DE MENINGITIS  
BACTERIANA, ECUADOR.2020

SARANGO YUNGA EILEEN CAROLINA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2020



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EXAMEN COMPLEXIVO

SENSIBILIDAD DE LA TINCIÓN DE GRAM EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO  
PARA EL DIAGNÓSTICO DE MENINGITIS BACTERIANA, ECUADOR.2020

SARANGO YUNGA EILEEN CAROLINA  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

SERAFIN ALVAREZ DIANA HAYDEE

MACHALA, 27 DE FEBRERO DE 2020

MACHALA  
27 de febrero de 2020

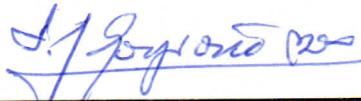
**Nota de aceptación:**

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado Sensibilidad de la tinción de Gram en líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de meningitis bacteriana, Ecuador.2020, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



---

SERAFIN ALVAREZ DIANA HAYDEE  
0919075259  
TUTOR - ESPECIALISTA 1



---

LOGROÑO BARRIONUEVO JORGE ISRAEL  
1705120192  
ESPECIALISTA 2



---

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH  
0702531351  
ESPECIALISTA 3

Fecha de impresión: viernes 28 de febrero de 2020 - 09:01

# TRABAJO PRÁCTICO EILEEN SARANGO

*por* Eileen Sarango

---

**Fecha de entrega:** 11-feb-2020 09:21a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 1255424788

**Nombre del archivo:** EILEEN\_SARANGO\_YUNGA.docx (266.4K)

**Total de palabras:** 5105

**Total de caracteres:** 27835

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, SARANGO YUNGA EILEEN CAROLINA, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado Sensibilidad de la tinción de Gram en líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de meningitis bacteriana, Ecuador.2020, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 27 de febrero de 2020



SARANGO YUNGA EILEEN CAROLINA  
0750178998

## RESUMEN

La meningitis bacteriana es una patología de la cual se han reportado casos alrededor del mundo, afecta al sistema nervioso causando inflamación de las meninges principalmente. Presenta una alta mortalidad incluso llegando a alcanzar cifras tales como 70% de casos fatales. Las principales bacterias causantes de meningitis bacteriana son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Por lo que es de vital importancia la utilización de técnicas de diagnóstico rápido y sensibles tal como la tinción de Gram.

La presente investigación tiene como objetivo analizar la sensibilidad de la tinción de Gram en muestras de líquido cefalorraquídeo en pacientes de 15 a 92 años mediante una búsqueda bibliográfica para el diagnóstico de meningitis bacteriana.

Se realizó un estudio descriptivo en el cual se analizaron 201 muestras de pacientes con diagnóstico de sospecha de meningitis bacteriana los mismos que no fueron sometidos a terapia con antibióticos. Se calculó la sensibilidad de la tinción de Gram como prueba de diagnóstico mediante la comparación de los datos obtenidos en los cultivos microbiológicos los cuales fueron considerados como gold estándar. La sensibilidad obtenida fue del 94,4%. Lo que indica que la tinción de Gram es una prueba que debe ser utilizada como primera línea para el diagnóstico de la meningitis bacteriana.

**PALABRAS CLAVES:** Meningitis bacteriana, tinción de Gram, sensibilidad, líquido cefalorraquídeo.

## **ABSTRACT**

Bacterial meningitis is a pathology of which cases have been reported around the world, affecting the nervous system causing inflammation of the meninges mainly. It has a high mortality even reaching figures such as 70% of fatal cases. The main bacteria that cause bacterial meningitis are: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Therefore, the use of rapid and sensitive diagnostic techniques such as Gram staining is vital.

The purpose of this research is to analyze the sensitivity of Gram staining in cerebrospinal fluid samples in patients aged 15 to 92 years through a literature search for the diagnosis of bacterial meningitis.

A descriptive study was carried out in which 201 samples of patients diagnosed with suspected bacterial meningitis were analyzed and were not subjected to antibiotic therapy. The sensitivity of Gram staining was calculated as a diagnostic test by comparing the data obtained in microbiological cultures which were considered as gold standard. The sensitivity obtained was 94,4%. This indicates that Gram staining is a test that should be used as the first line for the diagnosis of bacterial meningitis.

**KEY WORDS:** Bacterial meningitis, Gram staining, tenderness, cerebrospinal fluid.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	7
DESARROLLO.....	9
1. LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO .....	9
2. MENINGITIS BACTERIANA .....	9
2.1. SINTOMATOLOGÍA.....	9
2.2. TRATAMIENTO.....	9
2.3. ETIOLOGÍA .....	9
2.3.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	9
2.3.2. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	10
2.3.3. <i>Neisseria meningitidis</i> .....	10
2.3.4. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	10
2.3.5. <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.4. MANEJO PREANALÍTICO DE MUESTRAS DE LCR .....	11
2.4.1. Extracción de la muestra.....	11
2.4.2. Recolección de la muestra .....	11
2.4.3. Transporte y conservación de las muestras .....	11
2.5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO .....	11
2.5.1. Tinción de Gram.....	11
2.5.2. Diagnóstico de laboratorio para bacterias causantes de meningitis bacteriana.....	12
RESULTADOS .....	22
DISCUSIÓN .....	24
CONCLUSIONES.....	26
RECOMENDACIONES .....	27
BIBLIOGRAFÍA .....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Tabla de contingencia entre la tinción de Gram y el cultivo microbiológico ...	22
Tabla 2 Resultado calculado para la sensibilidad de la tinción de Gram .....	23

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Protocolo de identificación de bacterias causantes de meningitis bacteriana .....	21
--	----

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Tabla de contingencia 2x2 para calcular la sensibilidad de la tinción de Gram .....	12
---	----

## INTRODUCCIÓN

La meningitis bacteriana es un problema a nivel mundial, históricamente los tres patógenos que han reportado mayor cantidad de casos son: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*<sup>1</sup> y *Haemophilus influenzae* adjudicándose les cerca del 75 al 80% de casos a nivel global, los restantes han sido producidos por *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Neisseria meningitidis*<sup>2</sup>.

Esta enfermedad afecta al sistema nervioso y es de carácter infeccioso, muestra altas tasas de mortalidad, llegando a alcanzar los casos fatales hasta un 70%, tal es el problema que solo uno de cada cinco pacientes sobrevive a esta patología incluso pudiendo arrastrar secuelas permanentes como pérdida de la audición, desórdenes neurológicos y pérdida de extremidades<sup>2</sup>.

En países del primer mundo las tasas de mortalidad llegan hasta un 20%, por otro lugar en países en vías de desarrollo dichas tasas aumentan drásticamente alcanzando un 50% de mortalidad<sup>3</sup>.

Cada año se reportan cerca de 8000 a 10000 casos de meningitis bacteriana en Estados Unidos cuyo agente causal es *Haemophilus influenzae*<sup>3</sup>.

A nivel de Latinoamérica la situación es similar, en países como Colombia, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública emitió un reporte de 847 casos de meningitis bacteriana confirmada para el año 2016 siendo los agentes causales de mayor prevalencia *Mycobacterium tuberculosis* (49,35%), *Streptococcus pneumoniae* (17,8%) y otros agentes bacterianos (29,15%)<sup>4</sup>. En Costa Rica los reportes indicaron para el año 2013, 0,45 casos de mortalidad por cada 100000 habitantes<sup>5</sup>.

El líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentra rodeando al Sistema Nervioso Central, este se puede obtener mediante una punción lumbar, siendo este, el método más eficiente<sup>5</sup>.

Mediante el análisis del LCR se puede diagnosticar la meningitis bacteriana, una técnica considerada sensible y veloz es la tinción de Gram<sup>5</sup>, seguida de un cultivo microbiológico y pruebas bioquímicas como métodos de confirmación. Esta técnica de laboratorio posibilita identificar el 60 al 90% de los casos, lo cual se ve disminuido de sobremanera cuando los pacientes han sido sometidos a terapias antibióticas<sup>6</sup>. De igual manera su

capacidad de identificación de microorganismos patógenos incluidos los agentes causales de la meningitis bacteriana se ve disminuida con un manejo preanalítico inadecuado, incluyendo la utilización inadecuada de recipientes de recolección, errores de transportación y manejo de las muestras de LCR recolectadas <sup>7</sup>.

El objetivo de la presente investigación fue analizar la sensibilidad de la tinción de Gram en muestras de líquido cefalorraquídeo en pacientes de 15 a 92 años mediante una búsqueda bibliográfica para diagnosticar meningitis bacteriana.

## DESARROLLO

### 1. LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

El líquido cefalorraquídeo es un líquido incoloro, transparente, no presenta olor. Su formación se centra principalmente en los ventrículos laterales y los plexos coroideos. En una persona adulta, el volumen de LCR se encuentra fluctuando entre 90 y 150 ml <sup>2</sup>.

### 2. MENINGITIS BACTERIANA

La meningitis bacteriana es un síndrome que afecta al sistema nervioso <sup>8</sup>, siendo un proceso inflamatorio de las meninges <sup>9</sup> considerada de cuadro agudo <sup>5</sup>.

#### 2.1. SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas considerados como la triada clásica son vómitos, rigidez del cuello y náuseas. Entre otros síntomas a tener en consideración son: alteraciones del campo visual, elevación de la temperatura corporal, alteración del estado mental, hiporexia, adinamia entre otros <sup>5</sup>.

#### 2.2. TRATAMIENTO

El tratamiento indicado en esta enfermedad es una terapia antibiótica con cefalosporina de tercera generación, penicilina G y ampicilina, siendo indicados para los organismos susceptibles identificados, además de la adición de vancomicina <sup>8</sup>.

#### 2.3. ETIOLOGÍA

##### 2.3.1. *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae*, también conocido como neumococo, considerado un diplococo Gram positivo con tendencia a la formación de cadenas. Afecta a todas las edades, desde muy jóvenes a muy adultos, es considerado como una de las causas dominantes de meningitis bacteriana <sup>10</sup>. Entre un 30 y 60% de los casos se deben a este agente etiológico. Las personas que presentan asplenia ya sea quirúrgica o funcional y personas infectadas con VIH tienen un alto riesgo de contagio por este agente <sup>5</sup>.

La vacunación en pacientes esplenectomizados y mayores de 65 años, ha reducido las tasas de meningitis bacteriana causada por *S. pneumoniae* <sup>11</sup>.

### **2.3.2. *Haemophilus influenzae***

*H. influenzae*, es un cocobacilo Gram negativo no móvil, considerado una de las mayores causas de la meningitis bacteriana pediátrica, con altas tasas de mortalidad y pérdida auditiva <sup>10</sup>. En zonas donde existe vacunación contra esta bacteria las tasas de incidencia se reducen drásticamente hasta <5% <sup>5</sup>.

Durante la niñez, la vacunación ante este microorganismo ayuda a la baja incidencia de esta enfermedad <sup>11</sup>.

### **2.3.3. *Neisseria meningitidis***

Un 10 al 35% de los casos son causados por *N. meningitidis*, también conocido como meningococo, es un diplococo gramnegativo, es el principal responsable de la meningitis bacteriana en jóvenes adultos menores de 30 años, causando incluso casos esporádicos y epidemias <sup>10</sup>. Un signo sugestivo de meningitis bacteriana causada por este agente etiológico es la aparición de petequias en alguna parte del organismo <sup>5</sup>.

La vacunación es una medida preventiva pero no garantiza que exista protección ante todas las cepas excepto las de tipo A, C, Y o W-135 <sup>11</sup>.

### **2.3.4. *Listeria monocytogenes***

La incidencia de los casos por este patógeno es del 5 al 10% <sup>5</sup>. *L. monocytogenes*, es un bacilo grampositivo patógeno que causa meningitis preferentemente en neonatos, en adultos con alcoholismo, inmunosupresión, en mujeres embarazada y ancianos <sup>10,12</sup>. Cuando existen brotes estos se asocian a la ingestión de productos derivados lácteos que han presentado contaminación o carnes y verduras que no han sido cocinadas, mantiene una diseminación por el sistema digestivo <sup>5</sup>.

### **2.3.5. *Escherichia coli***

*E. coli*, es un bacilo gramnegativo puede producir meningitis bacteriana en adultos con factores de riesgo, es productor de un 0,7 a 4% de las meningitis comunitarias y se les atribuye un 14 a 61% de las meningitis nosocomiales con mayor preponderancia en pacientes intervenidos en operaciones neurológicas.

## **2.4. MANEJO PREANALÍTICO DE MUESTRAS DE LCR**

### **2.4.1. Extracción de la muestra**

Para la extracción de la muestra de líquido cefalorraquídeo se debe utilizar la técnica de punción aséptica estricta <sup>13</sup>

### **2.4.2. Recolección de la muestra**

La recolección debe realizarse acorde a las pruebas que se vayan a realizar con la muestra extraída: la primera parte de la recolección se realiza en un tubo tapa roja de polipropileno estéril, el cual se lo usa para pruebas bioquímicas. El segundo tubo es estéril, sin aditivos de tapa blanca y se usa para el estudio microbiológico y un tercer tubo de tapa lila estéril con anticoagulante EDTA, se utiliza para el recuento celular. El volumen a recoger para el estudio bacteriológico y de virus debe ser mayor a 2 ml, para el cultivo de hongos y micobacterias de 2 a 10 ml y para PCR múltiple de 0,5 ml <sup>14</sup>.

### **2.4.3. Transporte y conservación de las muestras**

El envío de las del prototipo de muestras para estudios bacteriológicos debe realizarse en menos de 15 minutos luego de la extracción de la muestra, ya que pueden lizarse los microorganismos como *Streptococcus pneumoniae* en una hora. Si no se puede hacer el transporte en el tiempo establecido, se deben mantener las muestras en una estufa a 35-37°C, más nunca refrigerar ya que afecta a la viabilidad de *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* <sup>14</sup>.

## **2.5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

### **2.5.1. Tinción de Gram**

Es un procedimiento que se utiliza para la identificación veloz de agentes microbiológicos. Es conocida como una tinción diferencial ya que al usar dos colorantes puede clasificar las bacterias en dos agrupaciones, conocidas como grampositivos con una coloración azul oscuro a morado y gramnegativos de color rosa o rojo <sup>15</sup>. Una tinción de Gram que se ha realizado con los correctos procedimientos tiene a ser positiva en un 75 – 90% de los casos. La identificación de los agentes causales se basa en morfología y la coloración que presente la tinción una vez ha sido realizada. Con esta técnica se pueden identificar cocos gram negativos como el meningococo, cocos grampositivos cuyos

ejemplos son: el neumococo y estafilococo, bacilos grampositivos como *H. influenzae* y bacilos gram positivos como la listeria, entre otros <sup>16</sup>.

Existe una probable correlación entre las cantidades menores a  $10^3$  UFC/ml muestran tinciones positivas en el 25% de los casos mientras que los valores se elevan drásticamente cuando la carga bacteriana es mayor a  $10^5$  UFC/ml <sup>17</sup>.

El volumen adecuado de LCR que se debe extraer para la realización de pruebas como la tinción de Gram es  $> 2$  ml <sup>16</sup>.

### 2.5.1.1. Sensibilidad de la tinción de Gram

Para el cálculo de la sensibilidad en una prueba diagnóstica como la tinción de Gram se debe contar con un estándar de oro como lo son, las pruebas microbiológicas, de este modo ambas pruebas son comparadas y permiten obtener la validez del cálculo de la sensibilidad, el mismo que se realiza utilizando una tabla de contingencia 2x2 <sup>18</sup>, tal como se instruye en el cuadro 1.

		Estándar de oro		Total
		Positivo	Negativo	
Prueba diagnóstica	Positiva	(a)	(b)	(a+b)
	Negativa	(c)	(d)	(c+d)
	Total	(a+c)	(b+d)	(a+b+c+d)

Cuadro 1 Tabla de contingencia 2x2 para calcular la sensibilidad de la tinción de Gram  
Fuente: Álvarez-Martínez, *et al.* <sup>18</sup>

### 2.5.2. Diagnóstico de laboratorio para bacterias causantes de meningitis bacteriana

Los cultivos microbiológicos son considerados la prueba *gold standard*, para emitir un diagnóstico de meningitis bacteriana, ya que se presentan positivos en un 80 a 90% de los casos analizados, tiene una sensibilidad considerada moderada pero maneja una alta especificidad <sup>5</sup>.

De acuerdo al diagnóstico de sospecha del médico tratante se procede en el laboratorio a la identificación del microorganismo causal. Para pruebas microbiológicas de

identificación se necesitan recolectar un volumen mayor a 2 ml de LCR <sup>16</sup>. Los principales medios de cultivo utilizados son:

- Agar sangre: Medio de cultivo usado para el aislamiento de diferentes tipos de microorganismos, si se utiliza un suplemento de sangre de oveja es capaz de permitir el desarrollo de microorganismos exigentes en su nutrición, tales como *S. neumoniae* <sup>19</sup>.
- Agar chocolate: Medio de cultivo que permite el desarrollo de organismos con exigencias nutricionales tales como *Haemophilus*, *Neisseria* y *Streptococcus* <sup>20</sup>.
- Agar tripticasa soja: Es un medio de cultivo nutritivo, es usado para el cultivo de microorganismos sin muchas exigencias de crecimiento, permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes* <sup>21</sup>.
- Agar MacConkey: Medio de cultivo usado para la identificación de bacterias con forma de bacilo Gram Negativo, las especies que son pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* se desarrollan en él <sup>22</sup>.

Diferentes pruebas bioquímicas son utilizadas para la confirmación y diferenciación posterior al cultivo microbiológico, tales como:

- Prueba de la sensibilidad a la optoquina: Es una prueba utilizada para la diferenciación de *S. pneumoniae* de otras especies pertenecientes al grupo de estreptococos alfa hemolíticos <sup>23</sup>.
- Prueba de solubilidad en bilis: Es una prueba usada para la diferenciación de *S. pneumoniae*, que se da por la capacidad de las sales de bilis de lisar a este microorganismo <sup>24</sup>.
- Prueba de la catalasa: Es una prueba utilizada para ensayar la presencia de la enzima catalasa, se usa especialmente para la diferenciación de ciertos géneros bacterianos como: *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, entre otros <sup>25</sup>.
- Determinación del requerimiento de factores X y V: Esta prueba se realiza con tiras o discos de papel los cuales contienen factores X y V, estas se colocan sobre un medio de cultivo como el agar tripticasa soya. La prueba se basa en la

dependencia de los microorganismos por los factores mencionados con lo que se observa en el medio un patrón de crecimiento a las inmediaciones de las tiras de papel <sup>24</sup>.

- Prueba de la oxidasa: Es una prueba rápida que sirve para la detección de una enzima llamada citocromo-c-oxidasa, lo cual permite la identificación de bacterias de los géneros: *Aeromonas*, *Neisseria*, *Vibrio*, *Moraxella*, entre otros <sup>24</sup>.
- Prueba de utilización de azúcares: Se utiliza para la identificación de *Neisseria meningitidis*, en la cual se añaden carbohidratos como dextrosa, maltosa, sacarosa y lactosa <sup>26</sup>.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Población:** Pacientes adultos de 15 a 92 años con diagnóstico clínico de meningitis bacteriana.

**Muestra:** 201 muestras de LCR.

**Objeto de estudio:** Bacterias causantes de meningitis bacteriana.

**Tipo de estudio:** Análisis descriptivo.

**Métodos:** Para la identificación de los microorganismos causantes de la meningitis bacteriana se utilizó la técnica de tinción de Gram, seguida por cultivos microbiológicos para la diferenciación bacteriana, tales como agar sangre y pruebas bioquímicas para *S. pneumoniae*. Agar chocolate o agar sangre con pruebas bioquímicas como oxidasa y prueba de azúcares para identificación de *N. meningitidis*. Agar chocolate con la prueba bioquímica de factores de crecimiento para la detección de *H. influenzae*, para la detección de *L. monocytogenes*, se realiza la siembra en agar tripticosa soya y prueba de catalasa como confirmación. Agar MacConkey para la detección de *E. coli*.

### **Criterios de exclusión:**

- Pacientes menores de 15 años.
- Pacientes sometidos a terapia con antibióticos.

### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes que presenten sintomatología de meningitis bacteriana
- Pacientes con edades mayores o iguales a 15 años.
- Pacientes sin antibioterapia.

**Material de estudio:** Artículos científicos, libros y material web.

### **Materiales y reactivos de laboratorio**

- Agua destilada
- Frasco lavador
- Alcohol etílico al 70%

- Tubos estériles tapa blanca, lila y roja
- Soporte de portaobjeto
- Portaobjetos
- Asa de siembra
- Cristal violeta
- Safranina
- Lugol
- Alcohol
- Aceite de inmersión
- Microscopio
- Cajas Petri
- Medios de cultivo: agar sangre, agar chocolate, agar tripticasa soja, MacConkey.
- Cabina de bioseguridad
- Estufa
- Mechero de alcohol
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Discos de optoquina
- Sales biliares

## **METODOLOGÍA**

**Obtención de la muestra:** El paciente debe colocarse decúbito lateral con las rodillas y cabeza flexionada, se procede a la desinfección de la piel con alcohol potable y alcohol yodado y se deja actuar durante 1 minuto, se procede a la inserción de la aguja, se extrae el LCR y se colocan los tubos de recolección de muestras, se debe extraer un volumen mínimo de 2 ml por tubo.

**Recolección de datos:** Se recolectó los datos de los pacientes tales como: número de identificación de la muestra, edad del paciente, hora de recolección y llegada al laboratorio, tipo de tubo colector, temperatura de la muestra.

**Transporte de las muestras:** Las muestras enviadas al laboratorio cumplió un periodo de 15 minutos para la realización de las pruebas microbiológicas de corte bacteriano y transportadas a temperatura ambiente.

### **Identificación de microorganismos causantes de meningitis bacteriana**

Para la identificación de los microorganismos causantes de meningitis bacteriana se siguió el siguiente protocolo:

#### **Tinción de Gram:**

1. Colocar sobre un portaobjeto una gota de agua destilada y una pequeña porción de muestra.
2. Hacer un frotis y dejar secar.
3. Pasar la placa sobre la llama de un mechero para fijar la preparación.
4. Cubrir con cristal violeta la placa durante un minuto.
5. Lavar el exceso con agua
6. Cubrir la placa con lugol durante un minuto.
7. Lavar el exceso con agua.
8. Lavar la placa con alcohol durante 30 segundos.
9. Lavar con abundante agua.
10. Cubrir la placa con safranina durante un minuto.
11. Lavar el exceso con agua.
12. Dejar secar al ambiente.
13. Añadir aceite de inmersión suficiente y observar al microscopio con lente de 1000x.

### **Identificación de *Streptococcus pneumoniae***

**Agar sangre:** Preparar agar base sangre en cantidad suficiente suspendiendo 40 g de agar en un litro de agua, llevar a ebullición para disolver, esterilizar a 121°C por 15 minutos, enfriar hasta 50°C, luego agregar 5 al 10% de sangre ovina desfibrinada estéril al medio previamente preparado. Realizar la siembra por inoculación directa haciendo estrías sobre la superficie, se cultiva a 35-37 °C durante 24 horas <sup>24</sup>.

**Prueba de la catalasa:** Tomar con la ayuda de un asa, una muestra de una colonia sospechosa de *S. pneumoniae*, colocarla sobre una placa portaobjeto, posteriormente agregar una gota agua oxigenada al 3%, observar la ausencia o presencia de burbujas <sup>24</sup>.

**Prueba de susceptibilidad a la optoquina:** Tomar una muestra de colonia sospechosa de *S. pneumoniae* con la ayuda de un asa estéril. Colocar la muestra en línea recta en una placa de agar sangre. Colocar sobre la estría recta un disco de optoquina de 6 mm, incubar la placa a 35°C durante 24 horas en una incubadora de CO<sub>2</sub> <sup>26</sup>.

**Prueba de solubilidad en bilis:** Tomar una muestra de la cepa sospechosa de *S. pneumoniae*, preparar una suspensión con 0,5 ml de solución salina estéril con una turbidez de 0,5 o 1,0 en la escala de McFarland. Tomar dos tubos de ensayo y dividir la suspensión, añadir 0,25 ml de solución salina en el primer tubo y 0,25 ml de sales biliares en el segundo tubo. Agitar los tubos e incubar a 35 – 37 °C durante un periodo de 2 horas <sup>26</sup>.

### **Identificación de *Haemophilus influenzae***

**Agar chocolate:** Preparar agar base chocolate en cantidad suficiente suspendiendo 40g de agar en un litro de agua, llevar a ebullición para disolver, esterilizar a 121°C por 15 minutos, enfriar hasta 80°C y mantenerlo a baño María, luego agregar 5 al 10% de sangre ovina desfibrinada estéril al medio previamente preparado, mezclar de forma suave, mantenerlo a baño María a 80°C durante 10 minutos. Realizar la siembra por inoculación directa haciendo estrías sobre la superficie, se cultiva a 35-37 °C durante 24 horas.

**Determinación del requerimiento de factores X y V:** Tomar una muestra de la colonia sospechosa de *H. influenzae* y realizar una siembra de forma masiva sobre la superficie del agar, posteriormente coloque discos o tiras que contienen factores X y V sobre la parte

del agar que ha sido inoculada con una distancia de separación de uno a dos cm. Incubar a 35°C en una incubadora en 3 a 5% de CO<sub>2</sub> durante un periodo de 18 a 24 horas <sup>24</sup>.

#### **Identificación de *Neisseria meningitidis***

Preparar agar chocolate o agar sangre enriquecidos con sangre de cordero al 5% mencionado en los procesos anteriores. Realizar la siembra por inoculación directa haciendo estrías sobre la superficie, se cultiva a 35-37 °C durante 24 horas.

**Prueba de la oxidasa:** Se coloca una porción de papel filtro sobre una de las colonias sospechosas de *N. meningitidis* previamente separadas con la ayuda de un asa de platino, se añade una gota de reactivo de oxidasa. Observar a los 10 segundos de la reacción la aparición de una coloración púrpura para un resultado positivo <sup>26</sup>.

**Prueba de la utilización de azúcares:** Tomar una porción de colonia sospechosa de *N. meningitidis* usando una aguja de inoculación. Inocular pinchando 10 veces la superficie de los tubos con los medios hasta llegar a una profundidad de 10 mm, usar una aguja diferente para cada tubo. Cerrar los tubos con dextrosa, maltosa, sacarosa, lactosa con las respectivas tapas e incubarlos a 35°C por al menos 72 horas y un máximo de 5 días <sup>26</sup>.

#### **Identificación de *Listeria monocytogenes***

**Agar tripticasa soja:** Pesar 40g del medio y disolverlo en un litro de agua destilada, se somete en calor para su total disolución y autoclavar a 121°C durante un periodo de 15 minutos, dejar enfriar hasta 50 °C y colocar 5% de sangre ovina sin fibrina y dispensar en la caja Petri. Sembrar en técnica de cuatro cuadrantes por aislamiento a 35-37°C durante 24 horas <sup>21</sup>.

**Prueba de la catalasa:** Tomar con la ayuda de un asa, una muestra de una colonia sospechosa de *L. monocytogenes*, colocarla sobre una placa portaobjeto, posteriormente agregar una gota agua oxigenada al 3%, observar la ausencia o presencia de burbujas <sup>24</sup>.

#### **Identificación de *Escherichia coli***

**Agar MacConkey:** Pesar 50 g de medio en un litro de agua previamente destilada. Se mezcla y se mantiene en reposo durante 10 a 15 minutos, calentar con agitación hasta ebullición durante un minuto para su total disolución, llevar a esterilizar a una autoclave a 121°C se espera 15 minutos, luego dejamos enfriar y dispensar en cajas Petri <sup>27</sup>.

### **Sensibilidad de la tinción de Gram**

Para el cálculo de la sensibilidad en la tinción de Gram en relación al estándar de oro (pruebas microbiológicas), se debe tomar en cuenta que la sensibilidad es la proporción de pacientes que se encuentran enfermos en los cuales la prueba es positiva y se calcula con la siguiente fórmula <sup>18</sup>:

$$Sensibilidad = \frac{a}{(a + c)} \times 100$$

Para ello se deben obtener los datos de la investigación en los que compara la prueba diagnóstica y el gold estándar tal y como se puede observar en el cuadro 1.

La sensibilidad de una prueba se expresa en porcentajes y a medida que estos se encuentren más cercanos al 100%, indicará que la prueba es más efectiva <sup>18</sup>.

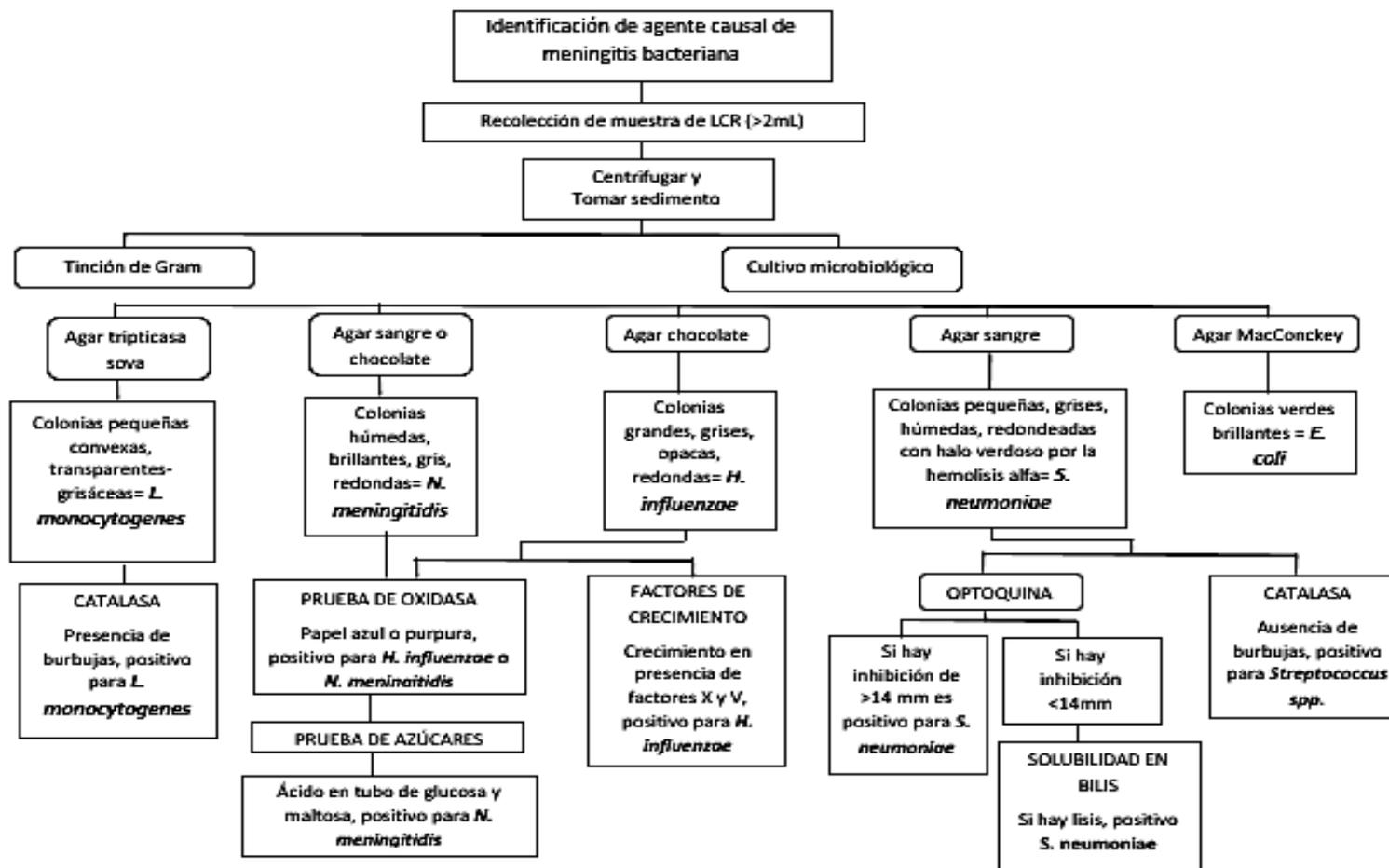


Ilustración 1 Protocolo de identificación de bacterias causantes de meningitis bacteriana

Fuente: Organización Panamericana de la Salud, 2012<sup>24</sup>

## RESULTADOS

Mediante la búsqueda bibliográfica se pudo determinar que las principales bacterias causantes de la meningitis bacteriana en Ecuador son:

Principales bacterias causantes de la meningitis bacteriana
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Escherichia coli</i>

**Tabla 1 Principales bacterias causantes de la meningitis bacteriana**

**Fuente:** Lobo, 2016<sup>5</sup>. Alvarado *et al.*, 2017<sup>3</sup>. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2019<sup>28</sup>.

Luego del análisis de las 201 muestras de líquido cefalorraquídeo cuyos pacientes tuvieron una edad comprendida entre 15 a 92 años. Se evaluó la sensibilidad de la tinción de Gram mediante la relación de la prueba diagnóstica de tinción de Gram y el gold estándar de cultivos microbiológicos.

<b>Tinción de Gram (Prueba diagnóstica)</b>	<b>Cultivo microbiológico (Gold estándar)</b>	
	Positivo (n) (%)	Negativo (n) (%)
Positivo (n=36)	34 (94,4)	2 (5,6)
Negativo (n=165)	24 (14,5)	141 (85,5)

**Tabla 2 Tabla de contingencia entre la tinción de Gram y el cultivo microbiológico**

En la tabla N°2 se muestra que, 36 pacientes fueron positivos en la tinción de Gram ya que se observaron microscópicamente bacterias en las placas teñidas, de los mismos, 34 pacientes resultaron verdaderos positivos en el cultivo microbiológico y 2 pacientes dieron negativo en el gold estándar por lo que son considerados falsos positivos. 165

pacientes resultaron negativos en la tinción de Gram, es decir, no se observaron bacterias en las placas con muestra de líquido cefalorraquídeo sometidas a tinción, de los cuales 24 pacientes ofrecieron resultados positivos en el cultivo microbiológico siendo considerados como falsos negativos y finalmente 141 pacientes tanto en la prueba diagnóstica como en el cultivo mostraron resultados verdaderos negativos.

La sensibilidad también conocida como la fracción de verdaderos positivos, muestra la posibilidad de que una técnica diagnóstica arroje un resultado positivo en un paciente enfermo, para calcular la sensibilidad de la prueba diagnóstica se utilizaron los datos de los pacientes que resultaron positivos en la tinción de Gram como se muestra en el cuadro 1, se tomaron los pacientes que fueron verdaderos positivos (34) y aquellos considerados como falsos positivos (2), la misma se calcula mediante la relación mostrada en la siguiente fórmula:

$$Sensibilidad = \frac{a}{(a + c)} \times 100$$

$$Sensibilidad = \frac{34}{(34 + 2)} \times 100$$

	<b>Sensibilidad (%)</b>
Tinción de Gram	94,4

**Tabla 3 Resultado calculado para la sensibilidad de la tinción de Gram**

## DISCUSIÓN

De los 201 casos sospechosos de meningitis bacteriana tomados como muestra en el estudio, sólo el 94.4% arrojó un diagnóstico positivo para meningitis bacteriana, el mismo que se obtuvo mediante una prueba diagnóstica de primera línea como lo es la tinción de Gram y con el posterior cultivo microbiológico como gold estándar.

La tinción de Gram es un procedimiento de bajo costo, rápido y bastante sensible. Es muy útil para la detección de la bacteria causante de la meningitis bacteriana en el 60 a 90% de los pacientes que no han sido sometidos a terapia antibiótica, es recomendado la realización de esta prueba en todas las muestras de LCR a los pacientes sospechosos de meningitis bacteriana, ya que su resultado podría orientar rápidamente el tratamiento antibiótico <sup>17</sup>.

Según Heckenberg *et al.* 2014, la tinción de Gram del líquido cefalorraquídeo, permite la identificación rápida de un organismo patógeno causal considerando el resultado de los cultivos microbiológicos con la técnica de tinción de Gram, el cual muestra una sensibilidad desde el 75% al 95% <sup>10</sup>, lo que coincide con el valor de sensibilidad calculado en esta investigación del 94,4%.

Lobo, 2016 <sup>5</sup> expresa que las principales bacterias causantes de meningitis bacteriana son: *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli*, lo que coincide con lo reportado por Alvarado *et al.* 2017, en la distribución de los principales organismos causantes de la meningitis bacteriana en Ecuador en un hospital de la ciudad de Guayaquil, siendo: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Escherichia coli*, en donde los principales casos reportados procedían de la provincia del Guayas <sup>3</sup>.

Según la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica del Ecuador, se han presentado 0,03 casos de meningitis bacteriana por cada 100000 habitantes desde el año 2013 al 2019 siendo el principal causante la bacteria llamada *Neisseria meningitidis* presentándose en pacientes con edades comprendidas entre los 12 a 64 años, habitantes de las provincias de Pichincha, Esmeraldas, El Oro, Chimborazo, Imbabura y Guayas <sup>28</sup>.

En un estudio realizado por Celis *et al.*, 2018, en donde se incluyeron 103 pacientes con una edad promedio de 37 años, los cuales fueron diagnosticados de meningitis bacteriana

mediante tinción de Gram, se encontró que la bacteria identificada de forma más frecuente fue el *Streptococcus pneumoniae*, el mismo que se identificó en el 25% de los casos <sup>29</sup>. Esta bacteria también es considerada por Álvarez-Martínez *et al.* 2009, como el germen que tiene mayor incidencia de casos de meningitis bacteriana en adultos, sosteniendo una mortalidad que alcanza el 37% <sup>30</sup>.

La bacteria *Neisseria meningitidis* causa el 10 al 35% de los casos de meningitis bacteriana, seguida por *Listeria monocytogenes* con una incidencia del 5 al 10%, *Haemophilus influenzae* presenta bajas tasas debido al desarrollo de vacunas contra este microorganismo siendo la incidencia menor al 5% y *Escherichia coli*. con casos que van desde el 1 al 10% de los pacientes <sup>5</sup>.

Según Pardo, 2016 <sup>31</sup>, la sensibilidad de la tinción de Gram de las bacterias causantes de la meningitis bacteriana son: *Streptococcus pneumoniae* 90%, *Haemophilus influenzae* 86%, *Neisseria meningitidis* 75%, *Escherichia coli* 50% y *Listeria monocytogenes* <50%.

## CONCLUSIONES

- Las principales bacterias causantes de meningitis bacteriana son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.
- La sensibilidad de la tinción de Gram de las muestras analizadas fue de 94,4%. Mediante la investigación bibliográfica realizada, se encontró que la sensibilidad de la tinción de Gram en muestras de líquido cefalorraquídeo de las principales bacterias causantes de la meningitis bacteriana es: *S. pneumoniae* 90%, *H. influenzae* 86%, *N. meningitidis* 75%, *E. coli* 50% y *L. monocytogenes* <50%.
- Se realizó un protocolo de identificación en muestras de líquido cefalorraquídeo de las principales bacterias causantes de meningitis bacteriana, siendo la prueba de primera línea la tinción de Gram, como gold estándar los cultivos microbiológicos; para la identificación de *Streptococcus pneumoniae*, se realizó una siembra en agar sangre y como test confirmatorios: la prueba de optoquina con una posterior prueba de solubilidad en bilis y la prueba de la catalasa. *Haemophilus influenzae* fue identificado con la siembra en agar chocolate y se realizaron las pruebas confirmatorias; prueba de la oxidasa y una prueba de factores de crecimiento. Se identificó *Neisseria meningitidis* con la siembra en agar chocolate o en agar sangre y se confirmó con la prueba de la oxidasa y una prueba de azúcares. *Escherichia coli* fue identificada con un agar selectivo como el agar MacConkey y finalmente la identificación de *Listeria monocytogenes* se realizó con la siembra de agar tripticosa soya y la confirmación mediante la prueba de la catalasa.

## **RECOMENDACIONES**

- Realizar investigaciones sobre la incidencia de las bacterias causantes de meningitis bacteriana en niños menores de 15 años en la ciudad de Machala.
- Promover las investigaciones de casos de meningitis bacteriana en la provincia de El Oro tanto nosocomiales como comunitarias para estimar el número de pacientes afectados.
- Se recomienda realizar prácticas preanalíticas, de manejo y transporte correctas de las muestras de alto valor clínico para evitar resultados incorrectos.
- Implementar técnicas rápidas, sensibles y efectivas de diagnóstico tales como PCR en los laboratorios locales para una pronta detección de la meningitis bacteriana en los pacientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bijlsma, M.; Brouwer, M.; Kasanmoentalib, E. S.; Kloek, A.; Lucas, M.; Tanck, M.; van der Ende, A.; van de Beek, D. Community-Acquired Bacterial Meningitis in Adults in the Netherlands, 2006-14: A Prospective Cohort Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16* (3), 339–347. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00430-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00430-2).
- (2) Abdelkader, M. M.; Aboshanab, K. M.; El-Ashry, M. A.; Aboulwafa, M. M. Prevalence of MDR Pathogens of Bacterial Meningitis in Egypt and New Synergistic Antibiotic Combinations. *PLoS One* **2017**, *12* (2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171349>.
- (3) Alvarado, K.; Vizueta, C.; López, B.; Zambrano, R.; Dávila, A. Incidencia de Meningitis Aguda En Pacientes Pediátricos Del Hospital “Francisco de Ycaza de Bustamante” Durante El Año 2010. *Dominio las Ciencias* **2017**, *3* (4), 104–122. <https://doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.4.oct.104-122>.
- (4) Valderrama, P.; Mahecha, Y.; Renteria, J.; Díaz, J.; Motta, M.; Hernández, M. Agentes Etiológicos Con Mayor Incidencia En La Meningitis Bacteriana. *Rev. Navarra Médica* **2018**, *4* (1), 23–31.
- (5) Lobo, J. Meningitis Bacteriana y Viral. *Med. Leg. Costa Rica* **2016**, *33* (1).
- (6) García, A.; Amador, M.; Pradere, J.; Nistal, J.; Gutiérrez, L. Pacientes Con Infección Del Sistema Nervioso Central. *Rev. Cuba. Med. Mil.* **2015**, *44* (1), 11–23.
- (7) López, R. Manejo y Transporte de Muestras En Microbiología. *Offarm* **2001**, *20* (08), 122–127.
- (8) Uribe, A.; Correa, S.; Rodriguez, L.; Barrientos, J.; Orozco, J. Características Clínicas, Epidemiológicas y Manejo Terapéutico de La Meningitis Pediátrica En Dos Instituciones de Medellín, Colombia. *Univ. y Salud* **2018**, *20* (2), 121. <https://doi.org/10.22267/rus.182002.116>.
- (9) Morales-Casado, M. I.; Julián-Jiménez, A.; Lobato-Casado, P.; Cámara-Marín, B.; Pérez-Matos, J. A.; Martínez-Maroto, T. Factores Predictores de Meningitis

- Bacteriana En Los Pacientes Atendidos En Urgencias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2017**, 35 (4), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.007>.
- (10) Heckenberg, G.; Brouwer, C.; Van de Beek, D. *Bacterial Meningitis*, 1st ed.; Elsevier B.V., 2014; Vol. 121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4088-7.00093-6>.
- (11) Ballester, L.; Capdevila, M. Meningitis Bacteriana Aguda En Adultos. In *Protocolos de enfermedades infecciosas*; Barcelona, 2015.
- (12) Betancur jimenez, C.; Mejia Saldarriaga, M.; Posada Velez, V. Meningitis Por Listeria Monocytogenes Con ADA Elevado En Paciente Inmunocompetente. *Acta Médica Colomb.* **2017**, 41 (2), 151–154. <https://doi.org/10.36104/amc.2016.626>.
- (13) Guzmán, A. Garantía de Calidad En El Laboratorio de Microbiología. *ARS MEDICA Rev. Ciencias Médicas* **2018**, 26 (3). <https://doi.org/10.11565/arsmed.v26i3.1268>.
- (14) Sáinz, C.; Álvarez, J.; Blas, J.; Escribano, E.; Carranza, R. *Manual de Recogida, Transporte y Conservación de Muestras*, 5ta ed.; 2020.
- (15) Esaú López-Jácome, L.; Hernández-Durán, M.; Colín-Castro, C. A.; Ortega-Peña, S.; Cerón-González, G.; Franco-Cendejas, R. Las Tinciones Básicas En El Laboratorio de Microbiología. *Investig. en Discapac.* **2014**, 3 (1), 10–18.
- (16) Reguera, R. M. Interpretación Del Líquido Cefalorraquídeo. *An. Pediatría Contin.* **2014**, 12 (1), 30–33. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(14\)70164-7](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(14)70164-7).
- (17) Colmenero, J.; González, M.; Jiménez, E.; Palomino, J.; Pérez, S.; Torres, M. Meningitis Bacteriana En Pacientes Adultos. *Av. en enfermedades Infecc.* **2006**, 7 (1), 1–57.
- (18) Álvarez-Martínez, H.; Pérez Campos, E. Utilidad Clínica De La Tabla 2 X 2. *Rev. Evid. e Investig. clínica* **2009**, 2, 22–27.
- (19) Laboratorios Britania S.A. Sangre Agar Base. *Britania* **2015**, 1, 2.
- (20) Laboratorios Britania S.A. Chocolate Agar Suplementado. *Britania* **2015**.
- (21) Callejo, R.; Prieto, M.; Martínez, C.; Aguerre, L.; Rocca, F.; Martínez, G. Manual

- de Procedimientos: Aislamiento, Identificación, y Caracterización de *Listeria Monocytogenes*. **2008**, No. July, 39.
- (22) Laboratorios Britania. Mac Conkey Agar. *Lab. Britania* **2015**, 1–2.
- (23) Laboratorios Britania S.A. Discos de Optoquina. **2012**, 1–2.
- (24) Organización Panamericana de la Salud. Procedimientos Para El Diagnóstico de Neumonías y Meningitis Bacterianas y La Caracterización de Cepas de *Streptococcus Pneumoniae* y *Haemophilus Influenzae*, SIREVA II. *Inst. Nac. Salud* **2012**.
- (25) MacFaddin, J. *Pruebas Bioquímicas Para La Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*, 3era edici.; Editorial médica Panamericana: Montevideo, 2003.
- (26) Perilla, M. J.; Ajello, G.; Bopt, C.; Elliot, J.; Facklam, R. R.; Knapj, J. S. Manual de Laboratorio Para La Identificación y Pruebas Susceptibilidad a Los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia Para La Salud Pública En El Mundo En Desarrollo. *Haemophilus Influenzae*, *Neisseria Meningitidis*, *Streptococcus Pneumoniae*., *Med. Lab.* **2004**, *15*, 49–67.
- (27) Dibico. Agar MacConkey. **2000**, No. Mexico, 1042.
- (28) Organización Panamericana de la Salud, E. Vigilancia Centinela de Neumonías y Meningitis Bacterianas Aguda En Menores de 5 Años. **2007**.
- (29) Celis, A.; Ospina, S.; Becerra, G. Utilidad Del Lactato En Líquido Cefalorraquídeo Como Biomarcador de Meningitis Bacteriana. *Infectio* **2018**, *22* (2), 64–69. <https://doi.org/10.22354/in.v22i2.710>.
- (30) Martínez-Hernández, L.; Cornejo-Juárez, P. Meningitis Bacteriana Aguda Por *S. Pneumoniae*. *Med. Interna Mex.* **2017**, *33* (1), 132–138.
- (31) Pardo, K. Grado de Cumplimiento de Manejo Pre Analítico En Muestra de LCR y Su Impacto Sobre El Desempeño Diagnóstico de La Coloración Gram Para El Diagnóstico de Meningitis Bacterianas En El Hospital Carlos Andrade Marín, Universidad Central del Ecuador, 2016.