



Material
Didáctico
para Estudiantes

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS:
Bacteriología y Virología

FQByF

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia



Universidad Nacional
de San Luis

SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES

Guías de Trabajos Prácticos: Bacteriología y Virología

Dra. Lucía Esther ALCARÁZ
Dra. Sara Elena SATORRES
Dra. Claudia Maricel MATTANA
Dr. Hugo José CENTORBI
Dra. Olga Elida ALIENDRO
Esp. Daniela Rosalía ECHENIQUE

FACULTAD DE
QUÍMICA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN LUIS

2018

Decana

Dra. Mercedes Edith CAMPDERRÓS

Vice Decana

Dra. Lucía Beatriz FUENTES

Secretaria académica

Dra. Estela Isabel GASULL

Comisión de la Serie Didáctica

Coordinadora

Dra. María Cristina ALMANDOZ

Integrantes

Departamento de Bioquímica

y Ciencias Biológicas

Dra. Susana I. SÁNCHEZ

Dra. Verónica P. FILIPPA

Departamento de Farmacia

Dr. Luis A. DEL VITTO

Dra. Alejandra O. MARIA

Departamento de Química

Dra. Yamina A. DÁVILA

Dra. María de los Ángeles ÁLVAREZ

Edición

Secretaría de Vinculación y Extensión

SUMARIO

La publicación periódica Serie Didáctica ha sido creada en el ámbito de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis (Ordenanza N° 008/07-CD) con el fin de proporcionar material de estudio a los estudiantes de las Carreras de grado impartidas en la Facultad.

Actualmente, la SERIE DIDÁCTICA: MATERIAL DIDÁCTICO PARA ESTUDIANTES (Resolución N° 269/16) ofrece guías de Trabajos Prácticos de Laboratorio y de campo, guías de resolución de problemas, material teórico, propuestas de estudios dirigidos y comprensión de textos, entre otros materiales, elaborados por el cuerpo docente de las diferentes Áreas de Integración Curricular de la Facultad. Estas producciones didácticas significan un aporte para cubrir necesidades académicas acorde al enfoque de cada asignatura o que no se encuentran habitualmente en bibliografía específica. Las mismas están disponibles en la página de la UNSL (<http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda.html>) lo que facilita la accesibilidad por parte de los estudiantes, docentes y comunidad educativa en general, garantizando la calidad de la visualización y la amplia difusión del material publicado en este sitio. De igual modo, la Serie Didáctica realiza una extensión invitando a docentes y alumnos de diferentes niveles educativos a participar, crear, producir y utilizar este espacio fomentando así el vínculo entre esta Institución y la comunidad.

En nuestra opinión, es de vital importancia producir y compartir el conocimiento con los estudiantes y la sociedad. De este modo, se tiende a facilitar los procesos de enseñanza y de aprendizaje y la transmisión de una idea directriz de conducta humana y científica, fortaleciendo los vínculos entre docentes-alumnos-conocimientos y sociedad.

Dado que la presente SERIE DIDÁCTICA resulta de la participación de numerosos actores, ante los posibles errores humanos y cambios en la ciencia, ni los editores ni cualquier otra persona que haya participado en la preparación del material didáctico garantizan íntegramente que la información sea precisa o completa.

ÍNDICE

PRESENTACIÓN DEL CURSO	1
BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	3
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°1	
FAMILIA Enterobacteriaceae. GENERALIDADES DE ENTEROBACTERIAS. MEDIOS DE CULTIVO	
Objetivos	6
Introducción teórica	6
Materiales y métodos	16
Actividades a desarrollar	29
Bibliografía	29
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°2	
INFECCIONES GASTROINTESTINALES. COPROCULTIVO	
Objetivos	30
Introducción teórica	30
Materiales y métodos	34
Actividades a desarrollar	52
Bibliografía	
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°3	
INFECCIONES URINARIAS. UROCULTIVO	
Objetivos	53
Introducción teórica	53
Materiales y métodos	56
Actividades a desarrollar	60
Bibliografía	
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°4	
BACILOS NEGATIVOS NO FERMENTADORES (BNNF). PSEUDOMONAS	
Objetivos	62
Introducción teórica	62
Materiales y métodos	64
Actividades a desarrollar	66

Bibliografía

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°5

INFECCIONES GENITALES

Objetivos	68
Introducción teórica	68
Materiales y métodos	77
Actividades a desarrollar	88
Bibliografía	

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°6

HEMOCULTIVO

Objetivos	90
Introducción teórica	90
Materiales y métodos	93
Actividades a desarrollar	101
Bibliografía	

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°7

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE LIQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Objetivos	102
Introducción teórica	102
Materiales y métodos	104
Actividades a desarrollar	107
Bibliografía	

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°8

INFECCIONES DE LAS VÍAS AÉREAS SUPERIORES

Objetivos	108
Introducción teórica	108
Materiales y métodos	111
Actividades a desarrollar	118
Bibliografía	

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°9

INFECCIONES DE LAS VÍAS AÉREAS INFERIORES. TUBERCULOSIS

Objetivos	119
Introducción teórica	119

Materiales y métodos	121
Actividades a desarrollar	143
Bibliografía	
TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°10	
BRUCELOSIS	
Objetivos	144
Introducción teórica	144

PRESENTACIÓN DEL CURSO

Nombre de la asignatura: BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA

La asignatura Bacteriología y Virología estudia la bioquímica y biología de las bacterias y virus, su clasificación, aislamiento e identificación, orientado hacia el diagnóstico. Se incluyen conceptos sobre patogénesis, inmunología, profilaxis y terapéutica, fundamentales para una formación integral del estudiante en estas disciplinas.

El contenido de esta asignatura se orienta, mediante un enfoque original, al estudio de bacterias y virus que causan enfermedades infecciosas (EI) con mayor frecuencia en el hombre, enfatizando en la patogénesis y diagnóstico de dichas infecciones, haciendo referencia a la aparición de nuevas EI, agentes etiológicos emergentes e infecciones nosocomiales especialmente en pacientes inmunocomprometidos lo que plantea continuamente nuevos desafíos.

Tipo de asignatura: La asignatura es de carácter obligatorio, perteneciente al ciclo de formación profesional, se dicta en el primer cuatrimestre de cuarto año del plan de estudios de la carrera Licenciatura en Bioquímica. Posee un crédito horario de 140 h y semanal de 10 h, distribuido en 4 horas de prácticos de laboratorio y 6 horas de clases teóricas.

Fundamentación del sentido de la asignatura dentro del plan de estudios

El avance de los conocimientos científicos en el campo de la Microbiología ha permitido un alto grado de desarrollo en disciplinas como Bacteriología y Virología. Los microbiólogos clínicos son parte del equipo de salud y cumplen un papel importante en el diagnóstico, manejo y prevención de las enfermedades infecciosas (EI). En las últimas décadas se han producido profundos cambios en el campo de la Microbiología:

a) reconocimiento de nuevos patógenos; b) aparición de nuevas manifestaciones clínicas; c) cambios en la epidemiología como consecuencia del descubrimiento de nuevos nichos ecológicos y formas de transmisión de algunas infecciones. Por otra parte la introducción de métodos diagnósticos asociados a técnicas altamente sofisticadas como las de biología molecular, bioquímica, inmunología y microscopía electrónica, ha permitido conocer en detalle la organización estructural de los agentes infecciosos y la patogenia de las enfermedades que producen. Asimismo, la aparición de nuevos mecanismos de resistencia bacteriana trae aparejado el descubrimiento de numerosos agentes antimicrobianos y pautas innovadoras para el control de las EI.

El dictado de la asignatura Bacteriología y Virología está precedido por otras dos

afines, Microbiología General e Inmunología que aportan importantes conocimientos para llevar a cabo este curso, lo cual permite abarcar aspectos más profundos e introducir conceptos avanzados en estas disciplinas.



NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Durante el transcurso de las actividades prácticas de la asignatura Bacteriología y Virología se trabajará con distintos materiales de origen biológico potencialmente patógenos. Por lo tanto es necesario desarrollar hábitos seguros de trabajo dentro del laboratorio para no poner en riesgo tu salud o la de tus compañeros.

¿Qué es la bioseguridad?

En general, podemos decir que cuando se habla de bioseguridad se habla de un conjunto de normas que se instrumentan en los laboratorios para proteger al personal de todo tipo de infección con agentes patógenos, contaminación con material radioactivo, intoxicación con drogas, solventes, etc.

En los laboratorios de análisis clínicos, el riesgo más frecuente es el de contaminación con agentes infecciosos. La mayoría de los microorganismos presentes en los líquidos biológicos pueden infectar al laboratorista ingresando al cuerpo humano de las siguientes formas:

1. por contacto: para evitar el ingreso de microorganismos por esta ruta se recomienda el uso de guantes durante el trabajo y su descarte posterior. Es importante que recuerdes que los mismos guantes pueden ser posteriormente una fuente de contaminación.
2. por vía oral: ¡No pipetear con la boca!
3. por vía ocular: el ingreso de microorganismos por esta ruta se evita utilizando máscaras y anteojos de seguridad, pero estas precauciones se toman en laboratorios especializados que necesitan mayores restricciones de bioseguridad.
4. por vía subcutánea o intradérmica: con agujas y material punzante contaminado.
5. por vía respiratoria: muchos microorganismos, entre ellos *Mycobacterium tuberculosis*, penetran por esta vía. Numerosos procedimientos de laboratorio (centrifugación, pipeteo vigoroso de fluidos, sonicación, etc.), tienen potencial riesgo de producir aerosoles (suspensiones compuestas por partículas secas o líquidas menores a 5 mm de diámetro).

Requisitos mínimos de bioseguridad para trabajar en el diagnóstico de tuberculosis:

Baciloscopía

Como el esputo es viscoso, es muy poco probable que genere aerosoles. La baciloscopía directa puede ser realizada sobre mesada, en un laboratorio adecuadamente ventilado (con 6 a 12 cambios de aire por hora). Esto se puede lograr simplemente abriendo ventanas o con un sistema de ventilación mecánico, sin generar corriente de aire en la mesada de trabajo. El laboratorio debe estar separado de otras áreas, con acceso restringido. El material infeccioso debe ser descontaminado en autoclave, olla a presión o por incineración.

En general, la mayoría de los agentes infecciosos se inactivan en lavandina común diluida 1/100 por al menos 1 hora. Por lo tanto, tanto la mesada de trabajo como el material utilizado debe ser descontaminado después de su uso con lavandina o algún otro desinfectante autorizado. Antes de descartar la sangre o cualquier líquido biológico, éstos deben ser también descontaminados de la misma manera.

Detallaremos brevemente las normas más importantes estandarizadas internacionalmente que aseguran un correcto manejo del material biológico.

NORMAS BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD

1. Nunca pipetear con la boca.
2. Manipular cualquier fluido biológico con cuidado, evitando derramamientos y la producción de aerosoles y gotas.
3. Evitar agitaciones y pipeteos bruscos.
4. Restringir el uso de agujas y jeringas a aquellos procedimientos para los cuales no existe otra alternativa; usar aguja y cualquier otro instrumento punzante con mucha precaución evitando la autoinoculación, descartar el material punzante en recipientes resistentes y no susceptibles a ser dañados por el material punzante.
5. Usar guardapolvo manga larga completamente abrochado y guantes.
6. Llevar el cabello recogido. No colocar pertenencias (bolsos, mochilas, etc) sobre las mesas de trabajo.
7. Lavarse las manos después de la actividad en el laboratorio, después de quitarse los guantes e inmediatamente después del contacto con material biológico.
8. Descontaminar las mesadas antes y después de su utilización e inmediatamente después del derramamiento de material.
9. No comer, beber, guardar alimentos, ni fumar dentro de los laboratorios.

10. Está prohibido el uso de prendas de laboratorio en: biblioteca, comedores, aulas, salas de reuniones, oficinas administrativas y otras áreas comunes ajenas al laboratorio.

Completar el cupón!

El **siguiente cupón** deberá ser completado y entregado al docente al inicio de la primera actividad práctica de la asignatura. La firma del mismo indica que el presente material relacionado a bioseguridad en el laboratorio ha sido leído minuciosamente lo que compromete al alumno a cumplir las normas establecidas.

ALUMNO:.....

DNI:.....

CARRERA:.....

FIRMA:.....

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°1
FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*. GENERALIDADES DE ENTEROBACTERIAS.
MEDIOS DE CULTIVO

OBJETIVOS

- Adquirir un conocimiento integral de la familia *Enterobacteriaceae*.
- Lograr destreza en la indentificación taxonómica de los principales géneros.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

Definición

La familia *Enterobacteriaceae* está constituida por un conjunto de microorganismos con las siguientes características: bacilos Gram negativos; no esporulados; las móviles lo son por flagelos peritricos; crecen en medios de cultivo simples de peptona o extracto de carne sin el agregado de suplementos como cloruro de sodio, vitaminas, factores de crecimiento; crecen bien en agar Mac Conkey; son aerobios y anaerobios facultativos; fermentan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas; son catalasa positivos y oxidasa negativos; reducen nitrato a nitrito y tienen un contenido de G+C del 39-59%.

Hábitat

Las Enterobacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran en el intestino de humanos y animales, suelo, agua, plantas. Algunas especies ocupan nichos ecológicos limitados como *Salmonella* Typhi que sólo se aísla de humanos; mientras que otras están ampliamente diseminadas en el medio ambiente, como por ej. *Klebsiella pneumoniae*.

Nomenclatura y taxonomía

La clasificación de los microorganismos se basa en el ordenamiento de los mismos en conjuntos y subconjuntos que resultan del estudio de caracteres morfológicos, culturales, bioquímicos, antigénicos y genéticos comparados con las propiedades de cepas tipo.

Inicialmente los géneros y las especies se definieron mediante el análisis de las propiedades bioquímicas y antigénicas. El desarrollo de nuevas técnicas como la

hibridación y secuenciación de los ácidos nucleicos, permitieron determinar las relaciones evolutivas de los microorganismos de la familia. El uso de hibridación ADN-ADN condujo al descubrimiento de nuevas especies y a la reclasificación de algunas de las ya existentes.

Los métodos empleados en la clasificación de los miembros de la familia son los siguientes:

- biotipificación
- serotipificación
- patrones de resistencia a los antimicrobianos
- fagotipificación
- técnicas de biología molecular
- determinación de la relación guanina-citosina (G+C)

La familia *Enterobacteriaceae* se subdivide en ocho tribus con los correspondientes géneros en cada una de ellas.

CUADRO 1
CLASIFICACIÓN (BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, 2009)
FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

GÉNERO	ESPECIE		
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>		
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i> <i>flexneri</i> <i>boydii</i> <i>sonnei</i>		
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	Subespecies <i>enterica</i> <i>otras</i>	Serovars (2400) Typhi Paratyphi A Paratyphi B Cholerasuis Enteritidis
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i> <i>koseri</i> <i>amalonaticus</i> otros		
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> <i>agglomerans</i> <i>aerogenes</i> otros		
<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> <i>ozaenae</i> <i>rhinoscleromatis</i> <i>oxytoca</i> <i>terrigena</i> <i>planticola</i>		
<i>Erwinia</i>	17 especies		
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i> <i>liquefaciens</i> otras		
<i>Hafnia</i>	<i>alvei</i>		
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>		
<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i> <i>mirabilis</i> <i>penneri</i> otros		
<i>Providencia</i>	<i>alcalifaciens</i> <i>stuartii</i> <i>rettgeri</i>		
<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>		
<i>Yersinia</i>	<i>pestis</i> <i>pseudotuberculosis</i> <i>enterocolitica</i> <i>intermedia</i> otras		
Existen otros géneros			

CUADRO 2
CARACTERES DIFERENCIALES DE LOS GÉNEROS *ESCHERICHIA*,
SALMONELLA*, *SHIGELLA* Y *CITROBACTER

	<i>Escherichia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Citrobacter</i>
Indol	+	-	d	D
R de Metilo	+	+	+	+
V. Proskauer	-	-	-	-
Citrato	-	+	-	+
LDC	+	+	-	-
Lactosa	+/x	D	-/x	+/x
SH ₂ en TSI	-	+	-	D

D: Reacciones diversas que pueden dar las distintas especies de un género.

d: Reacciones diversas que pueden dar las distintas cepas de una especie o serotipo.

x: positiva tardía o irregular.

LDC: lisina decarboxilasa.

CUADRO 3

Género	Especie	Subespecie	Serovars *
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	Typhimurium Enteritidis Typhi Paratyphi
		<i>salamae</i>	
		<i>arizonae</i>	
		<i>diarizonae</i>	
		<i>houtenae</i>	
		<i>indica</i>	
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>		

* existen alrededor de 2400 serovariedades.

La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie *enterica* y llevan un nombre por lo general relacionado con el lugar geográfico donde se aisló por primera vez. Dado que las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres, escapan al dominio del "Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana" y por ello deben escribirse en letra tipo romano, no en itálica, de la siguiente manera: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium; a los fines prácticos: *Salmonella* Typhimurium.

CUADRO 4
CARACTERES DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO SHIGELLA

Especie	Manitol*	ONPG	ODC	Dulcitol*	Sacarosa*	Xilosa*
<i>S. dysenteriae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. flexneri</i>	+	-	-	-	-	-
<i>S. sonnei</i>	+	+	+	-	-	-
<i>S. boydii</i>	+	-	-	-	-	+

*Fermentación

ONPG:ortonitrofenil beta d-galactopiranosido

ODC:ornitina decarboxilasa

Los cuatro miembros del género se pueden diferenciar entre sí, mediante una serie de pruebas bioquímicas. *S. dysenteriae*, *S. flexneri* y *S. boydii* son muy similares bioquímicamente y se diferencian por serología, en cambio *S. sonnei* es bioquímicamente diferente.

CUADRO 5
DIFERENCIACIÓN ENTRE ENTEROBACTER Y GÉNEROS RELACIONADOS

	<i>Enterobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i>
Movilidad	+	-	+	+
ODC	+	-	+	D
Arginina dehidrolasa	D	-	-	-
Citrato	D	D	-	+
Gelatinasa	-	-	-	D

D: DIFERENCIAS ENTRE ESPECIES

ODC: ornitina decarboxilasa.

CUADRO 6
CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO
ENTEROBACTER Y HAFNIA

	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>E. intermedium</i>	<i>E. amnigenus</i>	<i>H. alvei</i>
Sacarosa	+	+	-	+	+	d	d	-
Ureasa	d	-	-	-	+	-	-	-
ODC	+	+	-	+	+	+	d	+
Lisina decarboxilasa (LDC)	-	-	-	+	+	-	-	+
Arginina dehidrolasa	+	+	-	-	-	-	-	-
Citrato (Simmons)	+	+	d	+	+	d	d	-
Indol	-	-	d	-	-	-	-	-
Sorbitol *	+	-	-	+	-	+	-	-
Rafinosa *	+	+	-	+	+	+	+	-
Pigmento Amarillo	-	+	d	-	-	-	-	-

* fermentación

d: positivo entre el 50 y el 90%. ODC: ornitina decarboxilasa.

CUADRO 7
ESPECIES DE *KLEBSIELLA* DE IMPORTANCIA CLÍNICA. CARACTERES
DIFERENCIALES

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>
Gas de glucosa	+	D	+	-
Lactosa*	+	D	+	-
Indol	-	-	+	-
Rojo de Metilo	-/+	+	-	+
Voges- Proskauer	+	-	-	-
Citrato (Simmons)	+	D	+	-
Ureasa	+	D	+	-
Mucato*	+	-/+	+	-
LDC	+	-/+	+	-
Malonato	+	-	+	+
Movilidad	-	-	-	-

* Fermentación

+: 90% o más de los resultados positivos, -: 90% o más de los resultados negativos; d: diferente reacciones, +/-: más cepas positivas, algunas negativas, -/+ : más cepas negativas, algunas positivas. LDC: lisina decarboxilasa.

CUADRO 8

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE ESPECIES DEL GÉNERO *PROTEUS*

	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. penneri</i>
Indol	+	-	-
Rojo de metilo	+	+	+
Voges-Proskauer	-	d	-
Lactosa*	-	-	-
Sacarosa*	+	-	+
Maltosa *	+	-	+
Citrato	d	d	-
LDC	-	-	-
Fenilalanina	+	+	+
Glucosa (ac. gas)	+	+	+
D-xilosa (ac.)	+	+	+
Ureasa	+	+	+
ODC	-	+	-
Arginina dehidrolasa	-	-	-
SH ₂	+	+	-

CUADRO 9
CARACTERES DIFERENCIALES DE ESPECIES DEL GÉNERO *YERSINIA*

	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. enterocolítica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
LDC	-	-	-
ODC	-	+	-
Ureasa	-	+	-
Citrato Simmons (25°C)	-	-	-
Voges Proskauer (25°C)	-	+	-
Voges Proskauer (37°C)	-	-	-
Ramnosa *	-	+	-
Sacarosa *	-	+	-
Celobiosa *	-	+	-
Melibiosa *	d	-	+
Sorbitol *	-	+	-
Rafinosa *	-	-	d
Movilidad (25°C)	-	+	+
Movilidad (37°C)	-	-	-

+: 90% o más de las cepas son positivas; -: 90% o más de las cepas son negativas,
d: entre 50 y 90% son positivas.

*: fermentación.

CUADRO PRÁCTICO DE IDENTIFICACIÓN DE ENTEROBACTERIAS

TSI	Acción sobre *H de C en TSI	LDC	Bacteria	Pruebas bioquímicas					
				I	M	V	C	ODC	Urea
Pico y fondo amarillo	Fermentación glucosa y lactosa SH ₂ (-)	Descarboxila	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	d	-
			<i>K.pneumoniae</i>	d	-	+	+	-	+
			<i>E.aerogenes</i>	-	-	+	+	+	-
	Fermentación glucosa y sacarosa SH ₂ (-)	No descarboxila	<i>E.cloacae</i>	-	-	+	+	+	d
		Desamina	<i>P.myxofaciens</i>	-	+	+	d	-	+
Pico amarillo y fondo negro	Fermentación glucosa y sacarosa SH ₂ (+)	Desamina	<i>P.vulgaris</i>	+	+	-	+	-	+
	Fermentación glucosa y lactosa SH ₂ (+)	No desamina	<i>C.freundii*</i>	-	-	-	+	(-)	d
Pico rojo y fondo amarillo	Fermentación glucosa SH ₂ (-)	Descarboxila (d)	<i>E.coli</i> inactiva	(+)	+	-	-	(-)	d
		Descarboxila	<i>S.marscecens</i>	-	-	+	+	+	d
			<i>H.alvei</i>	-	d	d	-	+	-
		No descarboxila	<i>Shigella spp.</i>	d	+	-	-	d	-
			<i>C.diversus</i>	+	+	-	+	+	(+)
			<i>C.amalonaticus</i>	+	+	-	(+)	-	(+)
		Desamina	<i>M.morganii</i>	+	+	-	-	+	+
			<i>P.alcalifaciens</i>	+	+	-	+	-	-
<i>P.rettgeri</i>	+		+	-	+	-	+		
<i>P.stuartii</i>	+		+	-	+	-	d		
Pico rojo fondo negro	Fermentación glucosa SH ₂ (+)	Descarboxila	<i>E.tarda</i>	+	+	-	-	+	-
			<i>Salmonella spp.</i>	-	+	-	d	d	-
			<i>Salmonella Typhi</i>	-	+	-	-	-	-
		Desamina	<i>P.mirabilis</i>	-	+	-	d	+	+

d 26-27% de las cepas son positivas; (+) 76-89% de las cepas son positivas; (-) 11-25% de las cepas son positivas;

* lactosa (-)

* hidratos de carbono

I: indol

M: rojo de metilo

V: voges proskauer

C: citrato

Medios de cultivo frecuentemente usados para enterobacterias

MEDIOS DE TRANSPORTE		Medio de Cary y Blair Medio de Stuart
MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO		Caldo tetrationato de Mueller y Kauffman Caldo selenito de Leifson Agua Peptonada Alcalina
	No selectivos	Agar sangre Agar nutritivo Agar infusión cerebro corazón
		<u>Poco selectivos</u> Mac Conkey (MC) Eosina azul de metileno (EMB) Desoxicolato de Leifson (DL) Otros
MEDIOS DE AISLAMIENTO	Selectivos	<u>Moderadamente selectivos</u> Salmonella-Shigella agar (SS) Desoxicolato-citrato agar (DCA) Agar Hektoen Otros
		<u>Muy selectivos</u> Agar verde brillante (VB) Agar bismuto sulfito (BiSA) Otros
MEDIOS DE IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA		Buenos Aires modificado (BAM) Triple azúcar hierro (TSI) Doble Azúcar hierro o Kligler Iron Agar Lisina hierro Agar (LIA) Ornitina-Agar

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de transporte

Estos medios se usan únicamente en aquellos casos en que no se pueda realizar el cultivo inmediatamente de tomada la muestra. En el caso de la materia fecal, si ésta no es procesada pronto, se modifica su proporción bacteriana. A temperatura ambiente y con el transcurso de las horas, algunos gérmenes desarrollan predominando sobre otros, afectando su viabilidad, ya sea por variación del pH, producción de metabolitos tóxicos, etc. Si no se dispone de medios de transporte y la muestra no se va a procesar inmediatamente, pequeñas partículas de heces pueden desecarse sobre papel de filtro y guardarse en oscuridad a temperatura ambiente.

Medio de transporte Cary y Blair (composición en g/l)

Tioglicolato de sodio	1,5
Fosfato disódico	1,1
Cloruro de sodio	5,0
AD	1

pH 8,4

Calentar agitando hasta que la solución se aclare, enfriar hasta 50°C, agregar 9 ml de CaCl₂ 1% acuoso recién preparado y ajustar a pH: 8,4. Envasar en tubos o frascos previamente esterilizados volúmenes de 7 ml, esterilizar por vapor fluente durante 15 minutos.

Medio de transporte Stuart (composición en g/l)

Tioglicolato de sodio	0,9
Glicerofostato de sodio	10,0
Cloruro de calcio	0,1
Azul de metileno	0,002
Agar	3,0

pH 7,3± 0,2

Disolver 6 g de agar en 100 ml de agua destilada hasta ebullición. Aparte, en 900 ml de AD agregar 2 ml de ácido tioglicólico, 12 a 15 ml de NaOH 1N hasta pH 7,2; 100 ml de solución comercial de glicerofostato de Na al 20% y 20 ml de solución de CaCl₂ al 1%.

Agregar esta solución a la anterior y corregir el pH a 7,3-7,4. Por último adicionar 4 ml de solución acuosa de azul de metileno al 0,1%. Fraccionar 5 a 7 ml en tubo tapa a

rosca, esterilizar 1 hora a vapor fluente. Cerrar herméticamente. El medio antes de usar es incoloro. El medio de Stuart mantiene un pH favorable e impide tanto la deshidratación de la muestra durante el traslado como la oxidación y la autodestrucción enzimática de los gérmenes patógenos presentes.

Medios de enriquecimiento

Son medios líquidos. Se usan para inhibir la flora normal de las heces y favorecer la multiplicación de los gérmenes patógenos. A diferencia de los medios enriquecidos, no contienen suplementos nutritivos.

Tienen mucha aplicación cuando se desea, posteriormente, aislar *Salmonella* y *Shigella*.

Caldo tetrionato de Mueller y Kauffman (composición en g/l)

Proteosa peptona	5
Sales biliares	1
Carbonato de calcio	10
Tiosulfato de sodio	30

En el momento de usar, se agregan 2 ml de solución yodo yodurada a 100 ml del medio y 1 ml de solución de Verde Brillante al 1%.

Solución yodo yodurada:

Cristales de yodo	6
Yoduro de potasio	5
A. D	20 ml

Se distribuyen 10 ml por tubo. El medio presenta invariablemente abundante precipitado blanco. Debe usarse el mismo día en que se agrega la solución yodo yodurada. Este es un medio líquido de enriquecimiento, empleado para favorecer la multiplicación de *Salmonella*, a partir de heces, orina, agua, como así también de huevos, quesos y otros alimentos.

Fundamento

A partir del tiosulfato, se produce tetrionato en el medio de cultivo por la adición de iodo. El tetrionato reprime el crecimiento de coliformes y otras bacterias intestinales. Las *salmonellas* (también *Proteus* sp.) reducen el tetrionato y, por lo

tanto, no son inhibidas. El carbonato de calcio neutraliza el ácido sulfúrico liberado en la reducción del tetrionato. La bilis actúa estimulando el crecimiento de *Salmonellas*, pero inhibe a la flora asociada. El verde brillante reprime, sobre todo, a los gérmenes grampositivos.

Caldo selenito de Leifson

Triptona	5
Lactosa	4
Fosfato disódico	10
Selenito de sodio	4

pH: 7

Suspender c/u de los componentes en 1 l de AD estéril. Reposar 5 minutos y mezclar hasta homogenizar. Calentar agitando y hervir 2 minutos para disolver. No se debe esterilizar en autoclave. Enfriar a 45°- 50°C y distribuir en tubos estériles. (10 ml por tubo).

Modo de siembra:

A 8-10 ml de medio de enriquecimiento se añade aproximadamente 1 g de materia fecal si es recién emitida o bien 2 a 3 ml de la misma si proviene de un medio de transporte. A partir de estos medios de enriquecimiento se siembra en los medios selectivos. Para proceder a la tipificación de un germen es necesario previamente obtenerlo al estado puro cultivándolo en medios de aislamiento.

Medios de aislamiento

Son medios sólidos y se pueden clasificar en:

1) Medios no selectivos: no llevan sustancias inhibitoras, en ellos desarrollan todos los gérmenes que puedan subsistir a partir de los nutrientes que poseen.

2) Medios selectivos: además de los componentes comunes de todos los medios de cultivo, llevan por lo general un indicador de pH, sustancias inhibitoras y, en el caso de enterobacterias, lactosa para diferenciar los gérmenes fermentadores de los que no lo son. Los inhibidores comúnmente empleados son:

- Cristal violeta: inhibe bacterias Gram positivas
- Azul de metileno: inhibe gérmenes Gram positivos
- Sales biliares o desoxicolato: son sustancias tensioactivas que se encuentran

en la bilis. Inhiben a los gérmenes Gram positivos. Los bacilos entéricos se ven expuestos a ellos, por lo tanto, son bastante resistentes a su acción.

- Citratos: no se conoce el mecanismo de acción inhibitoria; podría ser que actuara como quelante fijando cationes divalentes esenciales. *Salmonella* y *Shigella* son menos sensibles que los organismos coliformes como *Escherichia* a la acción del citrato, pero algunas cepas de *Shigella* pueden ser inhibidas.

- Verde brillante: es bacteriostático, inhibe coliformes y *Pseudomonas*. Debe tenerse en cuenta que la inhibición depende de la concentración del agente.

Dentro de los indicadores de pH, los más usados son:

- Rojo neutro: en medio alcalino es amarillo
en medio ácido es rojo
- Rojo fenol: en medio alcalino es rojo
en medio ácido es amarillo

Los medios selectivos, se pueden agrupar en:

- Poco selectivos
- Moderadamente selectivos
- Muy selectivos

Medios Poco Selectivos

A estos medios se les agregan sustancias que inhiben el desarrollo de algunos gérmenes; generalmente se ven inhibidas la mayoría de las bacterias Gram positivas. Permiten el crecimiento de todas las enterobacterias.

En ellos se debe sembrar poco inóculo.

Agar Mac Conkey (composición g/l)

Peptona	17
Proteosa peptona	3
Lactosa	10
Sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5
Rojo neutro	0,3
Cristal violeta	0,001
agar	13,5
pH 7,1±0,2	

El medio es de color rojizo. Las colonias de las bacterias fermentadoras de lactosa (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) se ven de color rojo o rosadas, rodeadas de una zona de precipitación de sales biliares. Esto es debido a que al fermentar la lactosa se produce acidez la cual hace precipitar las sales biliares y absorber el rojo neutro.

Las bacterias no fermentadoras, como por ejemplo: *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, y las fermentadoras lentas (después de 24-48 horas), desarrollan formando colonias incoloras sin cambio en el medio.

Agar eosina azul de metileno (EMB) (composición g/l)

Peptona	10
Lactosa	5
Sacarosa	5
Fosfato dipotásico	2
Agar	13,5
Eosina	0,4
Azul de metileno	0,065
pH 7,1 ± 0,2	

Los gérmenes fermentadores de lactosa y/o sacarosa dan colonias oscuras o bien con centro oscuro y periferia traslúcida.

Escherichia coli suele presentar un brillo metálico característico, pero hay otros gérmenes del género *Enterobacter* que ocasionalmente lo presentan.

El color de las colonias se debe a:

- A la reacción de la eosina (colorante ácido) con el azul de metileno (colorante básico), formando un colorante compuesto neutro: eosinato de azul de metileno.
- La producción por parte de las colonias fermentadoras de un pH suficientemente bajo en el cual las colonias absorben el colorante.

Las colonias no fermentadoras, no se tiñen y permanecen incoloras por no tomar el colorante en medio alcalino.

Agar de Levine

Es una modificación del medio EMB y se diferencia por no poseer sacarosa en su composición.

Medios moderadamente selectivos

Llevar sustancias inhibidoras de la flora Gram positiva, además inhiben en parte a la flora coliforme.

Se usan generalmente para la búsqueda de *Salmonella* y *Shigella*.

Eso no significa que no puedan desarrollar otros gérmenes resistentes a estas sustancias inhibidoras.

Agar *Salmonella-Shigella* (S.S.) (composición g/l)

Extracto de carne	5
Proteosa peptona	5
Lactosa	10
Sales biliares	8,5
Citrato de sodio	8,5
Tiosulfato de sodio	1
Citrato férrico	15
Verde brillante	0,00033
Rojo neutro	0,025

pH: 7,0± 0,2

Suspender c/u de los componentes en 1 l de AD estéril. Reposar 5 minutos y mezclar hasta homogeneizar. Calentar agitando y hervir 2 minutos para disolver. No se debe esterilizar en autoclave. Enfriar a 45°- 50°C y distribuir en placas estériles.

El medio es de color rosado. Por tratarse de un medio selectivo, se puede sembrar abundante inóculo. Los gérmenes Gram positivos son inhibidos, como así también algunos coliformes debido a la presencia de verde brillante.

Es muy recomendado para el aislamiento de *Salmonella* y *Shigella*.

Los gérmenes no fermentadores de lactosa dan colonias incoloras; alguna bacteria fermentadora resistente que pudiera desarrollar, lo hará dando colonias de color rojizo.

Medios muy Selectivos

Contienen sustancias fuertemente inhibidoras. Generalmente se emplean para el aislamiento de *Salmonella*.

Agar verde brillante (VB) (composición g/l)

Extracto de levadura	3
Proteosa peptona	10
Lactosa	10
Sacarosa	10
Rojo fenol	0,08
Verde brillante	0,0125
Agar	20

pH 7

Esterilizar a 121°C durante 15 min. Este medio es altamente selectivo, recomendado especialmente para el aislamiento de *Salmonella*.

Salmonella desarrolla dando colonias típicas de color blanco- rosado opacas y rodeadas de una zona rojo brillante.

Escherichia coli no crece, es inhibida por el verde brillante aunque hay algunas cepas resistentes. En el caso de *Escherichia coli* resistentes u otras fermentadoras de lactosa o sacarosa que eventualmente pudieran desarrollar, lo hacen dando colonias de color verde amarillentas, rodeadas por una intensa zona amarilla.

Algunas cepas de *Proteus* pueden desarrollar dando colonias semejantes a las de *Salmonella*.

Agar bismuto sulfito (BISA) (composición g/l)

Extracto de carne	5
Peptona	10
Dextrosa	5
Fosfato disódico	4
Sulfato ferroso	0,3
Sulfito de bismuto	8
Verde brillante	0,025
Agar	20

pH 7

Este medio no se autoclava.

Es un medio recomendado para el aislamiento y diferenciación de *Salmonella* Typhi y otras Salmonelas, a partir de heces, orina, aguas servidas, portadores, etc. En este medio que originalmente es de color amarillento, *Salmonella* Typhi crece formando colonias de 1 a 4 mm, de color negro con brillo metálico intenso a su alrededor. El verde brillante y el bismuto inhiben considerablemente a los gérmenes de acompañamiento. El responsable del color negro es el sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de las colonias correspondientes. En este medio son inhibidos los gérmenes Gram positivos como así también la mayoría de los coliformes y *Shigella*. Algunos coliformes, *Serratia*, *Proteus* y otras pueden desarrollar dando colonias pequeñas, verdes hasta pardas, a veces mucosas.

RECORDAR:

Medios poco selectivos.....sembrar poco inóculo

Medios muy selectivos.....sembrar abundante inóculo

Medios de Aislamiento Selectivos

Medios de cultivo		Agente inhibidor	Indicador pH	Azúcar	Coloración de colonias	
					Fermentadoras	No Fermentadoras
Medios poco selectivos	Mac Conkey (MC)	Sales Biliares Cristal Violeta	Rojo Neutro	Lactosa	Rojo o Rosadas rodeadas de una zona de precipitación de sales biliares Ej: <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i>	Incoloras Ej: <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Proteus</i>
	Eosina Azul de metileno (EMB)	Azul de Metileno	Eosina (ácido) Azul de Metileno (básico)	Lactosa Sacarosa	Colonias oscuras o con centro oscuro y periferia translúcida, con o sin brillo metálico (<i>E. coli</i>)	Incoloras
Medios moderadamente selectivos	Agar Salmonella-Shigella (S-S)	Sales Biliares Citrato de Sodio Verde Brillante	Rojo Neutro	Lactosa	Rosadas, con o sin halo de precipitación	Incoloras
Medios muy selectivos	Agar verde brillante	Verde Brillante	Rojo fenol	Lactosa Sacarosa	Verde amarillentas, rodeadas de zona amarilla intensa.	Incoloras (rodeada de zona rojo brillante)
	Agar bismuto bisulfito	Verde Brillante		Glucosa	<i>Salmonella Typhi</i> : colonias color negro con brillo metálico alrededor	

Una vez obtenidas las colonias, se procede a su identificación.

Para ello, cada colonia de aspecto diferente se siembra en medios de identificación presuntiva.

Medios de identificación presuntiva

Son medios que se han introducido empíricamente para mostrar a partir de un único tubo diferentes características metabólicas del germen en estudio.

Medio Buenos Aires modificado: (BAM)

Peptona	2 g
Urea	1 g
Lactosa	0,3 g
Indicador de Andrade	0,3 ml
Agar	0,3 g
A. D (c.s.p.)	100 ml
Azul de timol	0,3 ml

pH 6,8

Indicador de Andrade:

Fucsina ácida	0,25 g
Hidróxido de sodio	16 ml
A.D. (c.s.p.)	100 ml

Azul de timol:

Azul de timol	1,6 g
Hidróxido de sodio	34,5 ml
A. D. (c.s.p.)	100 ml

Preparación:

Se realiza en dos etapas:

(A)	Peptona	2 g
	Agar	0,3 g
	A.D.	93,2 ml

Calentar hasta disolución. Enfriar a 20°C. Ajustar el pH a 6,8. Esterilizar durante 20' a 120°C. Si hay precipitado esterilizar nuevamente a 115°C 15'.

(B)	Solución de urea (acuosa) al 50%	2 ml
	Indicador de Andrade	1,5 ml
	Azul de timol	0,3 ml
	Solución acuosa de lactosa al 3%	3 ml

Al volumen total A enfriado a 70°C, se agrega asépticamente B.

Conservar en la heladera a 4°C hasta 20 días. En este medio se siembra por punción.

El color del medio es amarillo ámbar.

Interpretación:

Es un medio diferencial que permite observar la acción de los microorganismos sobre lactosa, urea y también movilidad.

- Sin cambio de color: no hay fermentación de lactosa ni hidrólisis de urea.
- Viraje al rojo: indica fermentación de lactosa (acidificación del medio).
- Viraje al azul: indica alcalinización del medio por hidrólisis de la urea.
- Para evidenciar la formación de SH_2 se agrega una tirita de papel de filtro embebida en acetato de plomo.
- También se puede observar la movilidad por ser un agar blando.

Agar triple azúcar hierro: (TSI) (composición g/l)

Extracto de carne	3
Extracto de levadura	3
Peptona	15
Lactosa	10
Glucosa	1
Sacarosa	10
Sulfato ferroso	0,2
Cloruro de sodio	5
Tiosulfato de sodio	0,3
Rojo fenol	0,024
Agar	12 g

pH 7,4

Envasar en tubos, esterilizar a 120°C 15', dejar solidificar semi inclinado. Sembrar por picadura hasta el fondo y en la superficie por estrías. El medio es de color rojizo.

En este medio se pone de manifiesto la capacidad de un determinado germen de fermentar lactosa, sacarosa y/o glucosa; como así también la producción de gas y SH_2 .

Interpretación:

- La producción de SH₂ se evidencia por la presencia de un color negro en el trazo de siembra debido a la formación de SFe.
- La producción de gas se evidencia por la aparición de burbujas en el interior del medio.
- La fermentación de azúcares produce compuestos ácidos que viran el indicador rojo fenol al amarillo.
- Los gérmenes que fermentan glucosa viran el color rojizo del medio a amarillo sólo en la profundidad.
- Los gérmenes que fermentan lactosa y/o sacarosa viran el medio a amarillo en superficie.
- Los gérmenes que no fermentan lactosa, glucosa ni sacarosa, no viran el color del medio; generalmente intensifican un poco el color rojizo debido a la alcalinización.

La detección de las reacciones de fermentación que determinan la formación de ácidos orgánicos y por lo tanto viran el indicador rojo fenol, depende de los siguientes factores:

- El delicado balance de las concentraciones de los distintos azúcares (1 g de glucosa, por 10 g de lactosa y 10 g de sacarosa), y de los constituyentes nitrogenados del medio.
- La lenta difusión a través del agar de los productos ácidos de la fermentación y de los productos alcalinos del metabolismo nitrogenado.
- La mayor producción de ácido en el ambiente anaerogénico existente en la profundidad del tubo (fermentación) comparado con la superficie aeróbica de la pendiente (respiración).

Así, un microorganismo que sólo fermenta glucosa (por ejemplo: *Salmonella*) producirá cantidades detectables de ácido en la profundidad del tubo (anaerobio) pero no en la superficie de éste (aerobio) donde las bases nitrogenadas formadas neutralizan totalmente la menor cantidad de metabolitos ácidos liberados en la respiración.

Los gérmenes que fermentan los azúcares más concentrados (lactosa y sacarosa) como por ejemplo: *Escherichia coli*, determinará la formación de suficiente cantidad de ácido como para difundir a través del medio y acidificar incluso la superficie.

Lisina hierro agar (LIA) (composición g/l)

Peptona	5
Extracto de levadura	3
Glucosa	1
Citrato de hierro amoniacal	0,5
L-lisina	10
Tiosulfato de sodio	0,04
Púrpura de Bromocresol	0,02
Agar	15
pH 6,7 ± 0,2	

Envasar 4 ml por tubo. Esterilizar en autoclave a 120°C 15', solidificar semi inclinado y sembrar por punción y estrías.

Las enterobacterias pueden desaminar, decarboxilar, o no decarboxilar la lisina. Además se puede visualizar la formación de SH₂ y producción de gas.

La lisina puede ser decarboxilada por microorganismos que poseen la enzima lisina decarboxilasa positivo, que la transforma en cadaverina (viraje del indicador al violeta); puesto que la decarboxilación sólo tiene lugar en el medio ácido, (pH inferior a 6) es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo por fermentación de glucosa.

Los microorganismos lisina decarboxilasa negativos pero fermentadores de glucosa, producen viraje al amarillo en la totalidad o fondo del medio de cultivo dependiendo del tiempo de incubación.

La desaminación de lisina produce ácido alfa-cetocarbónico, éste con la sal de hierro y bajo la influencia de oxígeno forma combinaciones pardo rojizas.

Decarboxilación: se observa el pico y el fondo de color violeta.

No decarboxilación: se observa el pico de color violeta y el fondo amarillo.

Simultáneamente en ambas reacciones puede aparecer o no ennegrecimiento por producción de SH₂ (Sfe).

Desaminación: se observa el pico pardo rojizo y el fondo amarillo.

Gas: burbujas en el medio en el caso positivo.

Prueba para la identificación de bacterias fermentadoras lentas de lactosa

Prueba de la Beta Galactosidasa

Fundamento:

Las bacterias fermentadoras de lactosa poseen dos enzimas: betagalactosidasa y galactósido permeasa. Ésta última permite que la lactosa atraviese fácilmente la membrana celular y sea hidrolizada por la otra enzima. Las bacterias fermentadoras lentas de lactosa poseen beta galactosidasa y no poseen galactósido permeasa, sin embargo tienen la capacidad genética de producirla. Las bacterias no fermentadoras carecen de ambas enzimas.

Cuando las bacterias fermentadoras lentas se siembran en un medio con lactosa, a medida que la población va creciendo en su presencia se van seleccionando las mutantes productoras de galactósido permeasa, luego éstas permiten el pasaje de lactosa hacia el interior de la célula donde será atacada por la beta galactosidasa; reacción que puede ocurrir entre 7 y 14 días.

Se puede demostrar rápidamente la presencia de la enzima, Beta galactosidasa, empleando un disco impregnado en ONPG. Si las bacterias poseen esta enzima el reactivo incoloro es hidrolizado liberando O-Nitrofenol, compuesto cromogénico amarillo. Para el ensayo colocar 0.2 ml de solución fisiológica en un tubo de hemólisis. Suspender una ansada del cultivo, colocar un disco de ONPG, e incubar 30 minutos a 37°C. Esperar hasta 4 h antes de descartar una reacción como negativa. Se recomienda el uso de un control positivo (*E. coli*) y uno negativo (*P. aeruginosa*).

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Observar e interpretar medios de transporte, enriquecimiento, aislamiento selectivo y no selectivo sembrados con diferentes géneros de Enterobacterias.
- Sembrar en medios de identificación presuntiva y realizar pruebas bioquímicas para la identificación taxonómica de las cepas incógnitas.
- Integrar la marcha de identificación bacteriana realizada.

BIBLIOGRAFÍA

- Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. Cap. 31: *Enterobacteriaceae*. Pág. 323-338. 5ta. Ed. España. 2006.
- WWW.Britania.com.ar. Formulaciones de medios de cultivo.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2009.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 2

INFECCIONES GASTROINTESTINALES. COPROCULTIVO

OBJETIVOS

- Adquirir conocimiento de la microbiota habitual del tracto digestivo y reconocer los microorganismos patógenos que se deben investigar en un coprocultivo.
- Obtener los conocimientos pertinentes a fin de optimizar la toma de muestra en diferentes circunstancias y tipo de paciente.
- Lograr habilidad para procesar correctamente la muestra generando información confiable y de utilidad concreta en el manejo de las infecciones intestinales.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Bacteriología Intestinal

La microbiota intestinal está constituida principalmente por anaerobios no esporulados.

De manera general se acepta que el tracto digestivo superior (estómago, duodeno, yeyuno e íleon) es estéril en el 69 al 71% de los casos o que presentan una escasa microflora constituida por microorganismos facultativos, predominantemente Gram positivos: estreptococos, lactobacilos aerobios, corinebacterias y hongos son los más representativos y su concentración total es generalmente menor que 10^4 gérmenes por ml de jugo intestinal. Estos microorganismos son capaces de sobrevivir a la acidez gástrica y provienen de la cavidad oral colonizando el estómago y el intestino superior después de las comidas, aunque en personas en ayunas se observa la presencia de reducida cantidad de estos microorganismos.

La porción terminal del íleon presenta una zona de transición y la microecología empieza a cambiar con la aparición de microorganismos Gram negativos como coliformes y bacteroides anaerobios.

La válvula íleo-cecal actúa como una verdadera barrera entre las especies Gram positivas predominantes en el intestino delgado superior y los microorganismos Gram negativos del colon. En esta porción del intestino es de particular importancia el aumento en la población de **anaerobios**: bacteroides, lactobacilos anaerobios y clostridios que son los mayores constituyentes de la flora colónica.

Los datos del cuadro I referente a la flora bacteriana en el tracto digestivo son en su mayoría obtenidos de adultos y tienen validez para niños que reciben una

alimentación general.

El tracto digestivo del feto es estéril. En el momento del nacimiento ocurre una masiva invasión bacteriana por la microflora de la piel de la madre y del medio ambiente, resultando una rápida colonización del tracto digestivo, incluyendo el meconio.

Bajo la influencia de la leche materna una microflora consistente en un 90% de *Bifidobacterium bifidus* (lactobacilos bífidus) se desarrolla entre 3º y 4º día de vida, con una importante reducción o ausencia de bacterias putrefactivas. Se encuentran además otras bacterias como *Streptococcus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, coliformes y bacterias anaerobias incluyendo *Clostridium sp.*

La importancia del *Bifidum bacterium bifidus* radica en su acción antibacteriana, producción de vitaminas y ahorro proteico.

Cuadro I: Distribución de la microbiota intestinal

Porción intestinal	Concentración de Gérmenes	Gérmenes aislados
Estómago Yeyuno Ileon	Estéril o menos de 10^4 /ml	Predominio de Gram positivos: estreptococos, lactobacilos, hongos, difteroides y algunos coliformes.
Ileon (porción terminal)	$10^5 - 10^8$ /ml	Además de la flora anterior aparecen los Gram negativos: bacteroides y coliformes.

Válvula ileocecal: zona de transición

Colon	$10^9 - 10^{11}$ /ml	Predominio de anaerobios (95%): bacteroides, bifidobacterias, clostridios. Aerobios: coliformes, enterococos, lactobacilos.
Heces	10^{12} /g.	El 90% de la flora fecal es anaerobia estricta.

Factores que regulan el desarrollo y mantenimiento de la microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal no puede funcionar normalmente si no existe una microflora adecuada que debe mantenerse en equilibrio, para ello el organismo posee

mecanismos reguladores que impiden un sobredesarrollo de la microflora y la colonización del intestino por bacterias patógenas.

Estos factores reguladores son:

- Barrera bactericida gástrica
- Sales biliares y motilidad intestinal
- Sistema inmunosecretor. La mucosa intestinal tiene la capacidad de disponer

de una respuesta inmunológica que es distinta e independiente de la respuesta sérica. Existe un marcado predominio en la mucosa intestinal de células conteniendo IgA que supera a las células productoras de IgM e IgG.

Enfermedad diarreica

Las infecciones del tracto gastrointestinal representan un grave problema de salud pública. La diarrea es la manifestación más común de esas infecciones, las cuales constituyen una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en lactantes y niños menores de cinco años, con el mayor número de casos en los países en vías de desarrollo de Asia, África y Latinoamérica.

Se entiende por **diarrea** al aumento del número, volumen o fluidez de las deposiciones de un individuo en relación con su hábito intestinal normal.

Patógenos que se deben investigar en un coprocultivo

Si bien la flora microbiana presente en las heces es muy variada, en la práctica, la búsqueda se orienta habitualmente hacia la familia *Enterobacteriaceae* por comprender gérmenes de reconocida acción patógena a nivel intestinal.

Salmonella, *Shigella* y *Escherichia coli* enterovirulentas son los responsables más frecuentes de gastroenteritis infecciosa.

También se debe buscar *Yersinia enterocolítica* y *Campylobacter jejuni* que son menos frecuentes. Esto no significa que otros grupos no tengan valor como agentes etiológicos, como los virus (Rotavirus), parásitos, bacterias y hongos de sobreinfección entre los que se destacan *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, los cuales están normalmente en escasa cantidad.

También pueden originar infecciones gastrointestinales gérmenes anaerobios del género *Clostridium*.

Importancia del coprocultivo

El coprocultivo tiene especial valor porque permite realizar el diagnóstico etiológico de las infecciones intestinales, como así también permite detectar los portadores sanos.

Estadísticamente se ha visto que sólo un 15 a 30% de las diarreas se deben a gérmenes patógenos. Por este motivo, se debe tratar con antibióticos siempre que se encuentre el agente causal, porque las diarreas pueden ser de origen vírico, deficiencias enzimáticas que llevan a mala absorción de hidratos de carbono, grasas, etc.

Los tratamientos con antibióticos injustificados pueden producir efectos secundarios tales como la destrucción de la microbiota normal, como así también se puede suministrar con los antibióticos factores de resistencia a la flora habitual e inducir a la colitis pseudomembranosa producida por *Clostridium difficile*.

A veces, las diarreas curan por seguir el curso natural de una enfermedad de carácter benigno. En otros casos, la dieta, el transitorio reposo del tubo digestivo y la reposición hidroelectrolítica y de flora intestinal es de gran utilidad, ya que el mayor peligro de las diarreas es la deshidratación y el desequilibrio electrolítico del suero.

Se denomina **coprocultivo** al estudio de la materia fecal para el aislamiento e identificación de las bacterias productoras de diarrea. Esto es difícil de realizar en el laboratorio por la infinidad de microorganismos que pululan en el intestino, por eso la búsqueda se orienta habitualmente a los gérmenes más frecuentes de reconocida acción patógena:

Enterobacterias

Escherichia coli enterovirulentas

Salmonella enterica

Shigella sp.

Yersinia sp.

Vibrio cholerae y *V. parahaemolyticus*

Campylobacter jejuni, *C. coli*, *C. Lari*

Técnica del coprocultivo

Recolección de la muestra

- **En adultos:** por deposición espontánea en recipientes estériles.
- **En lactantes:** es útil el hisopado rectal. Es aconsejable evitar la toma directa del pañal salvo cuando la deposición es reciente.
- **Conservación y transporte de la muestra:** si no se cultiva de inmediato antes de las 2 h, se recomienda colocarla en un medio de transporte: Cary Blair y mantenerla a temperatura ambiente por un lapso no mayor de 5 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de la muestra

Examen macroscópico de la muestra:

Es importante para determinar la presencia de sangre, mucus, parásitos, etc., en la materia fecal.

Examen microscópico:

- **En fresco:** colocar entre porta y cubreobjeto una gota de lugol y emulsionar en ella una ansada de materia fecal, con el objeto de detectar la presencia de parásitos. En el mismo portaobjeto colocar una gota de azul de metileno de Löefler, emulsionar en ella una ansada de materia fecal (porción mucopiosanguinolenta) colocar el cubreobjeto, dejar actuar 2 a 3 min. Permite poner de manifiesto la presencia de leucocitos.

Se observan leucocitos en shigelosis, salmonelosis, fiebre tifoidea, enteritis por *Escherichia coli* invasiva.

No se observan leucocitos en diarreas por *Escherichia coli* toxigénica no invasiva, *V. cholerae* ni en diarreas virales o no específicas.

- **Previa coloración:** extender una ansada de materia fecal en un portaobjetos y colorear al Gram. Es importante establecer el equilibrio entre la flora Gram positiva y Gram negativa presente.

Cultivo:

Una vez concluido el estudio directo macro y microscópico, junto a datos epidemiológicos que orientan acerca de la probable etiología, se dejan anotadas en el protocolo todas las características del caso en estudio. Consignados estos datos se procede a la siembra, para lo cual se recomienda seleccionar con hisopo estéril, las porciones mucosas, purulentas o sanguinolentas que provienen de las regiones inflamadas del intestino y realizar una suspensión en solución fisiológica estéril si las heces no son líquidas, de lo contrario sembrar directamente con hisopo y “abrir” con ansa. Paralelamente sembrar en medio de enriquecimiento (medio líquido).

Ver marcha general para coprocultivo (pág. 47)

Investigación de bacterias pertenecientes a los géneros *Salmonella* y *Shigella*

- 1- Siembra en medios de enriquecimiento (líquidos)
- 2- Siembra en medios de aislamiento (sólidos)
- 3- Selección de colonias y siembra en medios diferenciales
- 4- Pruebas bioquímicas
- 5- Pruebas serológicas

Siembra en medio de enriquecimiento:

Los que se emplean con mayor frecuencia son el caldo de selenito de sodio (para *Salmonella* y *Shigella*) y el caldo tetrionato de Müeller-Kauffman (para *Salmonella*). Se siembra en la proporción 1:10, por ejemplo: 1 g de materia fecal (porciones sospechosas) por 10 ml de medio. Se suspende el material tratando de disgregarlo y luego de tapado el tubo se mezcla suavemente por rotación entre las manos y se incuba a 37°C.

Hay que trabajar con atención para evitar proyectar material contaminado sobre la mesada u otros objetos de trabajo y, sobre todo, manejar con habilidad los tapones de los tubos para evitar su contaminación.

Siembra en medios de aislamiento:

A partir de los medios de enriquecimiento se siembra en medios de aislamiento muy selectivos como por ejemplo: SS, VB, etc.

Los medios más usados para el desarrollo de *Shigella* son SS y para *Salmonella*: VB, BiSA, SS.

Selección de colonias y siembra en los medios diferenciales:

Los diferentes tipos de colonias desarrolladas en las placas se eligen de acuerdo a su acción sobre la lactosa.

En SS las colonias "sospechosas" de *Salmonella* y *Shigella* (no fermentadoras) conservan el color del medio de cultivo y se diferencian claramente de las fermentadoras de la lactosa que en estos medios se tornan rojas y opacas.

En VB las colonias "sospechosas" de *Salmonella* se observan de color rosado rodeadas de una zona rojo brillante.

En BiSA las colonias negras a las 24 h corresponden frecuentemente a *Salmonella* Typhi, otras especies de *Salmonella* dan colonias oscuras, mientras que las fermentadoras que pudieran desarrollar lo hacen pobremente dando colonias verdosas.

Proteus vulgaris y *Proteus mirabilis* suelen desarrollar dando también colonias negras pero se diferencian fácilmente porque dan la prueba de la ureasa positiva.

Las colonias "sospechosas" de todas las placas en estudio, previa coloración de Gram, son repicadas a un medio diferencial como puede ser: TSI o BAM.

De todas las colonias "sospechosas" se seleccionan entre tres y cinco colonias

de las más representativas de cada placa. En cada tubo de medio diferencial se repica una colonia "pura", es decir, totalmente aislada. Los tubos una vez sembrados se incuban durante 24 h. Además se siembra en agar nutritivo (AN) inclinado para un posterior estudio serológico.

Pruebas Bioquímicas:

Se siembra una "pequeña batería" de medios para pruebas bioquímicas elegidas de acuerdo a la lectura de las pruebas en los medios diferenciales usados (ver cuadro).

Se incuba 24 h a 37°C y se procede a la interpretación de los resultados. Basándose en los resultados de las pruebas bioquímicas se efectúan los estudios serológicos para confirmar la identificación de la bacteria.

Pruebas Serológicas:

Serología para Salmonella:

Una ansada de cultivo de 18 h en agar nutritivo se suspende en cada uno de los sueros polivalentes "O" para *Salmonella*. Si se produce aglutinación con alguno de ellos, se ensayará con los monovalentes que comprende la mezcla. Toda cepa que no aglutine con ninguno de éstos, debe ser probada con el suero Vi, ya que podría tratarse de una diarrea por *S. Typhi*.

Serología para Shigella:

Una ansada de cultivo de 18 h en agar inclinado se suspende en una gota de SF y luego en los sueros de *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*. Cuando no hay aglutinación, debe suspenderse en 2 ml de SF y calentarse a ebullición durante 30 min, con el objeto de destruir la cápsula si existiera. En caso de existir negatividad, debe probarse la cepa con los sueros Alkaescens-Dispar, (*Escherichia coli*, anaerogénica). Si algún suero de aglutinación da positivo, se ensaya con los monovalentes correspondientes.

Observaciones:

- Cuando en las siembras efectuada el primer día no se aíslan colonias "sospechosas", debe intentarse aislamiento hasta el quinto día inclusive a partir de los medios de enriquecimiento, conservados en incubación.
- El objeto de sembrar el primer día, medios de aislamiento además de los de enriquecimiento, es adelantar en un día los resultados.
- En caso de aislar *Salmonella* o *Shigella* se realiza el antibiograma correspondiente a

partir de un cultivo "puro".

Ver esquema de Aislamiento y Tipificación (pág. 44)

Investigación de *Escherichia coli* enterovirulentas

Las especies de *Escherichia coli* incluyen un gran número de serotipos. Algunos de estos son miembros de la microbiota intestinal habitual, mientras que otros causan infección intestinal tanto en el hombre como en los animales.

Los serotipos de *E. coli* que causan infección intestinal en el hombre pertenecen a cinco grupos:

- *E. coli* enterotoxigénica (ECET)
- *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)
- *E. coli* enteropatógena (ECEP)
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)
- *E. coli* enteroadherente (EAEC)

Los serotipos de ECET producen infecciones que se localizan en el intestino delgado y se adquieren por ingestión de alimentos, agua en contacto directo. Las cepas pueden producir una o dos clases de enterotoxinas denominadas LT y ST.

LT (termolábil) es de naturaleza proteica y alto peso molecular, denominada también "cólera similar".

ST (termoestable) es un polipéptido de bajo peso molecular. Se han descrito dos clases: STa y STb pero solamente la primera ha sido asociada a infecciones humanas.

Los serotipos de ECEI actúan por penetración en el epitelio del intestino grueso produciendo un cuadro denominado "Shigella similar".

Las cepas presentan características bioquímicas del género *Escherichia* pero son inmóviles y no decarboxilan la lisina.

Los serotipos de ECEP son los asociados con diarreas infantiles. No producen enterotoxina LT ni ST ni invaden la mucosa, se adhieren al ribete en cepillo y lo destruyen.

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC), ha sido descrita en Estados Unidos, Canadá y en nuestro país, asociada a ingestión de hamburguesas contaminadas con *E. coli* 0157:H7. Esta cepa produce una citotoxina (verotoxina) semejante a la de Shigella que inhibe la síntesis proteica y es la responsable del

Síndrome Urémico Hemolítico (SUH).

Los serotipos de EAEC probablemente sean citotóxicos (no se ha establecido aún su mecanismo de acción).

Aislamiento e identificación

Se basa en el estudio de las propiedades bioquímicas y serológicas.

- 1- Siembra de medios de aislamiento
- 2- Selección de colonias fermentadoras
- 3- Pruebas serológicas presuntivas
- 4- Pruebas bioquímicas

1- **Siembra en medios de aislamiento:** a partir de una ansada de la suspensión de materia fecal, se siembra en una placa con medio poco selectivo: EMB, Mac Conkey, etc. Se incuba a 37°C durante 18-20 h.

2- **Selección de colonias:** Se seleccionan 7-8 colonias fermentadoras de la lactosa y se repican cada una de ellas, en agar nutritivo inclinado y en medio citrato de Simmons. Se incuba a 37°C durante 18-20 h.

3- **Pruebas serológicas presuntivas:** Si el medio Citrato de Simmons es negativo (sin desarrollo), se realiza la serología a partir de una suspensión en 2 ml de SF desde agar nutritivo sembrado en el día anterior. Si el citrato de Simmons vira al azul descarta *E. coli*.

Técnica: la suspensión se divide en dos partes: una se usará para la aglutinación K y la otra, calentada durante 30' a 100°C para la O. Se usan sueros K y O separadamente, con muy buenos resultados.

Aglutinación capsular en lámina: una gota de suspensión sin calentar se mezcla con cada uno de los sueros polivalentes OK que comprenden los serotipos patógenos reconocidos como *E. coli* EPI. Si se obtiene aglutinación con uno de estos sueros, se enfrenta nuevamente la suspensión con los monovalentes correspondiente a la mezcla.

Aglutinación somática en lámina: se procede de igual manera que en el caso anterior pero empleando como antígeno la suspensión calentada.

Cuando se produce aglutinación simultánea con más de un suero, puede deberse a una cepa rugosa que debe ser descartada.

4- **Pruebas bioquímicas:** La determinación serológica, exige la confirmación bioquímica del género ya que existen bacterias del género *Citrobacter* que presentan antígenos comunes, por tal motivo a partir del agar nutritivo cuya serología fue positiva se siembra para pruebas bioquímicas.

Ver esquema de Aislamiento y Tipificación (pág 42)

Investigación de *Yersinia enterocolitica*

Siembra en medios de aislamiento:

El medio más usado es el agar CIN (cefsulodin-irgasan-novobiocina) donde desarrollan colonias pequeñas (1-1,5 mm) de borde definido con centro rojo oscuro y rodeado por una zona más clara. La pigmentación roja es resultado de la fermentación de manitol. Bacterias Gram positivas son inhibidas por cristal violeta, Irgasan y novobiocina. La selectividad contra otras bacterias Gram negativas se debe a cefsulodin. Incubar 24h a 37°C. Menos usado es el agar Mac Conkey donde se observan colonias incoloras, debido a que se trata de microorganismos no fermentadores de lactosa. Incubar 48 h a 22-25°C. Las colonias sospechosas se siembran en medios diferenciales. Posteriormente en una pequeña batería de pruebas bioquímicas y se confirman serológicamente.

Método de enriquecimiento:

Para muestras de origen humano se recomienda el caldo modificado de Rappaport (MRB) que inhibe el desarrollo de Gram positivos por verde de malaquita, y de Gram negativos por carbenicilina. Incubar 48 h a 22-25 °C. Posteriormente sembrar en agar CIN.

En frío: Colocar la muestra en buffer fosfato salino (PBS), pH 7,6, en relación muestra: PBS igual a 1:10. Incubar 21 días a 4°C. Sembrar en los medios mencionados y proceder a identificación (ver esquema pág 45).

Investigación de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*

Investigación en muestras fecales:

Las heces se recogen en las primeras 24 h de la enfermedad directamente o por hisopado rectal, antes de que el paciente haya recibido tratamiento con antimicrobianos. Deben sembrarse inmediatamente o colocarse en medio de transporte de Cary Blair que mantiene la viabilidad hasta 4 semanas. Las muestras se siembran en medio no selectivo como agar sangre y en medio selectivo: TCBS, y se continúa según esquema (pág. 46).

Aislamiento e Identificación:

Tener en cuenta con respecto al aislamiento que no crecen bien en medios altamente selectivos usados para enterobacterias. El medio de elección es Agar Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa (TCBS), que es un medio comercial donde *V. cholerae* desarrolla colonias planas de gran tamaño, amarillas (por fermentación de sacarosa). Las colonias de *V. parahaemolyticus* son de 3 a 5 mm de diámetro con un centro verde azulado.

Pruebas bioquímicas:

- **TSI:** *V. cholerae* produce acidez desde glucosa y sacarosa (amarillo en profundidad y superficie, sin gas ni SH₂). *V. parahaemolyticus* solamente acidifica la glucosa (amarillo en profundidad, rojo en superficie, sin gas ni SH₂).
- **Oxidasa:** ambas especies dan esta prueba positiva y se realiza en forma idéntica a enterobacterias.
- **Hugh y Leifson:** fermenta glucosa, sin gas.
- **Actividad hemolítica:** *V. parahaemolyticus* produce beta hemólisis, se conoce como fenómeno de Kanagawa: se toma una ansada de cultivo de 18 h en Trypticase Soya Caldo (con 3% de NaCl) y siembra en una placa de agar sangre. Se incuba a 37°C 24 h y se observa beta hemólisis.

Diferenciación serológica de *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae O1: Aglutina frente al antisuero O1. Se trata de la cepa que ocasiona "el cólera".

Vibrio cholerae NO O1: No aglutina frente al antisuero O1. Es agente causal de brotes esporádicos de gastroenteritis aguda, con diferentes grados de severidad e infecciones extraintestinales en humanos. También se lo llama *Vibrio cholerae* no aglutinable o no O1.

Vibrio cholerae O139: Aglutina frente al antisuero O139, al igual que *Vibrio cholerae* O1 es responsable de epidemias y pandemias de cólera que han llevado a la muerte a miles de personas en todo el mundo.

Características bioquímicas diferenciales

Prueba	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Movilidad	+	+
Oxidasa	+	+
Gelatinasa	+	+
Desarrollo NaCl 0%	+	-
NaCl 1%	+	+
Reducción de Nitrato	+	+
Arginina dihidrol.	-	-
Lisina decarbox.	+	+
Ornitina decarb.	+	+
Sacarosa	+	-
Beta hemolisina	-	+
Indol	+	-

Medio TCBS: Tiosulfato-Citrato-Sales biliares-sacarosa-agar

Extracto de levadura	5 g
Peptona de carne	5 g
Peptona de caseína	5 g
Citrato de sodio	10 g
Tiosulfato de sodio	10 g
Bilis de buey	8 g
Sacarosa	20 g
Cloruro de sodio	10 g
Citrato férrico	1 g
Azul de timol	0,04 g
Azul de bromotimol	0.04 g
Agar	14 g
Agua destilada	1.000 ml

pH: 8,6

Diferenciación de 12 especies del género *Vibrio* de importancia clínica

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	<i>V.cholerae</i>	<i>V.mimicus</i>	<i>V.metschnikovii</i>	<i>V.cincinnatiensis</i>	<i>V.hollisac</i>	<i>V.damsela</i>	<i>V.fluvialis</i>	<i>V.furnisii</i>	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>	<i>V.carchariae</i>
						-	-	-	-	-	-	-
						+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de Nitrato				+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ferm.del inositol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina dehidrol.	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Lisina descarbox.	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Ornitina descarbox.	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Sacarosa	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+

Investigación de *Campylobacter* spp.

Diagnóstico Microbiológico:

Se recomienda la toma de una porción de la deposición espontánea en un recipiente estéril y refrigerar a 4°C hasta su siembra. También se puede obtener la muestra con hisopado rectal utilizando el medio de transporte de Cary Blair.

Examen directo: es útil para una rápida identificación presuntiva en caso de diarrea aguda. Con microscopio de contraste de fases o campo oscuro se observan los bacilos espiralados con movimiento de flecha o tumbos. La coloración de Gram permite observar morfología típica: curvas, en S, o de espiral alargada.

Cultivo: el medio de cultivo a usar es Agar Skirrow o Agar Mueller-Hinton, suplementado con 5-7% de sangre de carnero, mezcla antibiótica (trimetroprima, vancomicina, anfotericina, cefalotina) y suplemento de aerotolerancia (FBP): sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio. Las placas se siembran en forma directa con hisopo o con 2-3 gotas de deposiciones acuosas, se disemina por estría. La incubación se realiza en atmósfera de microaerofilia a 42°C, 24-48 h.

Atmósfera de incubación: Existen varios métodos para obtener una atmósfera adecuada para el desarrollo de estos microorganismos.

- **Reemplazo de una atmósfera normal por una mezcla de gases apropiada:** se retira el aire contenido en una jarra anaeróbica con bomba de vacío y se reemplaza por una mezcla conteniendo 85% de nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno.
- **Sobres generadores de gases especiales para *Campylobacter*:** son sobres que se consiguen en el comercio (BBL, Oxoid, Bio-Merieux) que aportan una atmósfera aproximada de 5-10% de oxígeno y 5-12% de dióxido de carbono.
- **Jarra con vela:** la combustión de la vela aporta una atmósfera aproximada de 17-19% de oxígeno y de 2-4% de dióxido de carbono que mejora el aislamiento de *Campylobacter* si se incluye al medio de cultivo el suplemento FBP que aumenta alrededor de 10 veces la aerotolerancia del microorganismo. El rendimiento de este método es mayor a 42-43°C que a 37°C.

- **Generadores caseros:** reduce la atmósfera de oxígeno por consumo en reacción química y aumenta la de dióxido de carbono por medio de la disolución de bicarbonato de sodio en agua. Entre ellos tenemos:

Método A.

- Una pastilla de borato de sodio (0,8 gr para una jarra de 3 lts)
- Una pastilla de antiácido (Alka Seltzer o Yastá).
- 10 ml de agua

Método B.

- Lana de acero
- Solución ácida de sulfato cúprico (Sulfato de cobre 5 g; agua 100 ml; ácido sulfúrico 0,33 ml; Tween 80 0,2 ml).

Método de filtración para la detección de *Campylobacter* en heces (pág 40)

El método se basa en la separación de *Campylobacter* del resto de la flora microbiana presente en las heces, como por ejemplo los coliformes, que quedan retenidos en la superficie de la membrana de celulosa de 0,45 o 0,66 μm ; los bacilos que logran penetrar la membrana se depositan sobre un medio rico con sangre que actuará como sustrato para el crecimiento del microorganismo. De esta manera se obtiene un cultivo selectivo, situación que reemplaza a la adición de antibióticos.

Procedimiento

Acomodar con una pinza los filtros estériles de celulosa de 0,45 μm , esperar a que se adhieran al medio. Realizar una suspensión de materia fecal en solución fisiológica, (si la diarrea no es acuosa) y con una micropipeta o pipeta Pasteur, depositar aproximadamente 100 μl sobre la membrana, tratando que no se derrame sobre el medio de cultivo. Dejar que se filtre por un tiempo mínimo de 30 min, luego levantar el filtro con la pinza y desecharlo. Estriar el filtrado con un ansa. Incubar en microaerofilia durante 24-48 h.

Identificación: las colonias de *Campylobacter* típicas son lisas, grisáceas, no hemolíticas, extendidas a lo largo de la estría, con aspecto acuoso. El examen en fresco de la colonia, muestra bacilos con activos movimientos en tirabuzón.

Toda bacteria con esos caracteres y que sea catalasa y oxidasa positivas, puede clasificarse tentativamente como *Campylobacter* del grupo *jejuni-coli*.

En base a otras pruebas metabólicas se pueden identificar las especies termotolerantes de *Campylobacter* (*jejuni*, *coli* y *lari*), estas pruebas incluyen hidrólisis de hipurato, SH_2 , sensibilidad al ácido nalidixico, sensibilidad a la cefalotina.

FIGURA 1. Técnica de Filtración con Membrana de celulosa para la Detección de *Campylobacter* spp en Heces

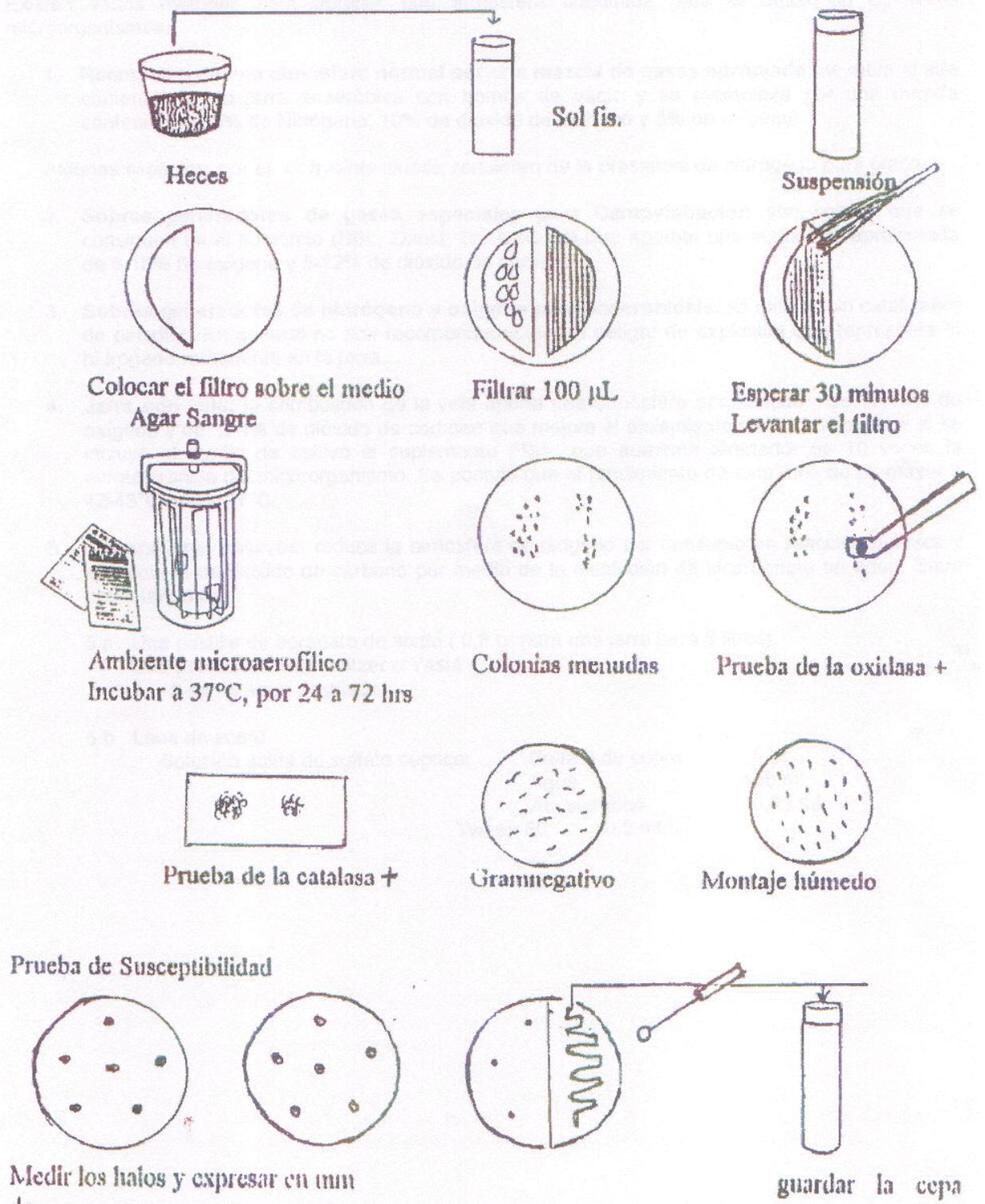


Figura extraída de tesis Doctoral Ana M. Abdón: Bacteriología, Epidemiología y Ecología de *Campylobacter* gastroentéricos. UNSL. 2004.

Investigación de *Clostridium difficile*

Se lo encuentra normalmente en un porcentaje considerable en el intestino del recién nacido y niños, pero en pequeña proporción en adultos. Su acción patógena está relacionada con la colitis pseudomembranosa como consecuencia de la terapia antimicrobiana prolongada. También puede estar asociado a patologías consecutivas al empleo de agentes citotóxicos, en exacerbaciones de enfermedad intestinal inflamatoria y en complicaciones de la obstrucción del intestino con estrangulación.

La mayoría de las cepas de *C. difficile* producen una toxina que es citopática para líneas celulares en cultivo de tejidos.

Además se ha descrito una enterotoxina que podría tener un papel más importante en lo referente a la patogenia de la enfermedad.

Aislamiento e Identificación:

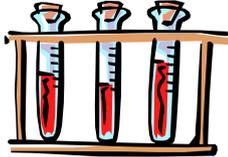
A partir de materia fecal de pacientes con colitis por *C. difficile*, se realiza una coloración de Gram, que revela la presencia de leucocitos polimorfonucleares y predominio de bastones Gram positivos relativamente finos, largos con sus lados perfectamente paralelos.

Para cultivo primario, el medio de elección, que permite la rápida identificación presuntiva es el Agar cicloserina-cefoxitina-fructosa al que se le puede adicionar yema de huevo incubando en anaerobiosis. Las colonias tienen un diámetro aproximado de 2 mm o más después de 24 h. de incubación, que examinadas a la luz ultravioleta muestran una fluorescencia amarilla. Es fundamental para el diagnóstico la investigación de la enterotoxina (toxina A) y citotoxina (toxina B). No todas las cepas son toxigénicas.

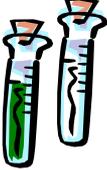
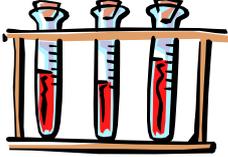
Para la identificación bioquímica de este microorganismo se pueden realizar las siguientes pruebas: movilidad (+), lecitinasa (-), lipasa (-), indol (-), gelatinasa (+), fermentación de azúcares: fructuosa (+), glucosa (+), manitol (+), lactosa (-), maltosa (+).

ESQUEMAS DE AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN

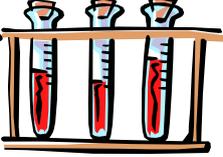
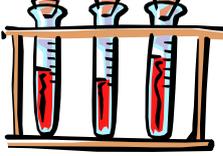
ESQUEMA DE AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE *E. coli* enterovirulentas

1º DIA	<p>Siembra de la muestra en medio poco selectivo (EMB)</p> <p>Incubar 24h a 35-37°C</p> 
2º DIA	<p>Selección de 7-8 colonias fermentadoras</p>  <p>Siembra de agar nutritivo y citrato</p> <p>Incubar 24h a 35-37°C</p>
3º DIA	 <p>Serología presuntiva de <i>E.coli</i> enterovirulentas</p>  <p>Marcha bioquímica (IMViC)</p> <p>Incubar 24h a 35-37°C</p>
4º DIA	<p>Confirmación bioquímica y serológica de <i>E.coli</i> enterovirulentas</p>

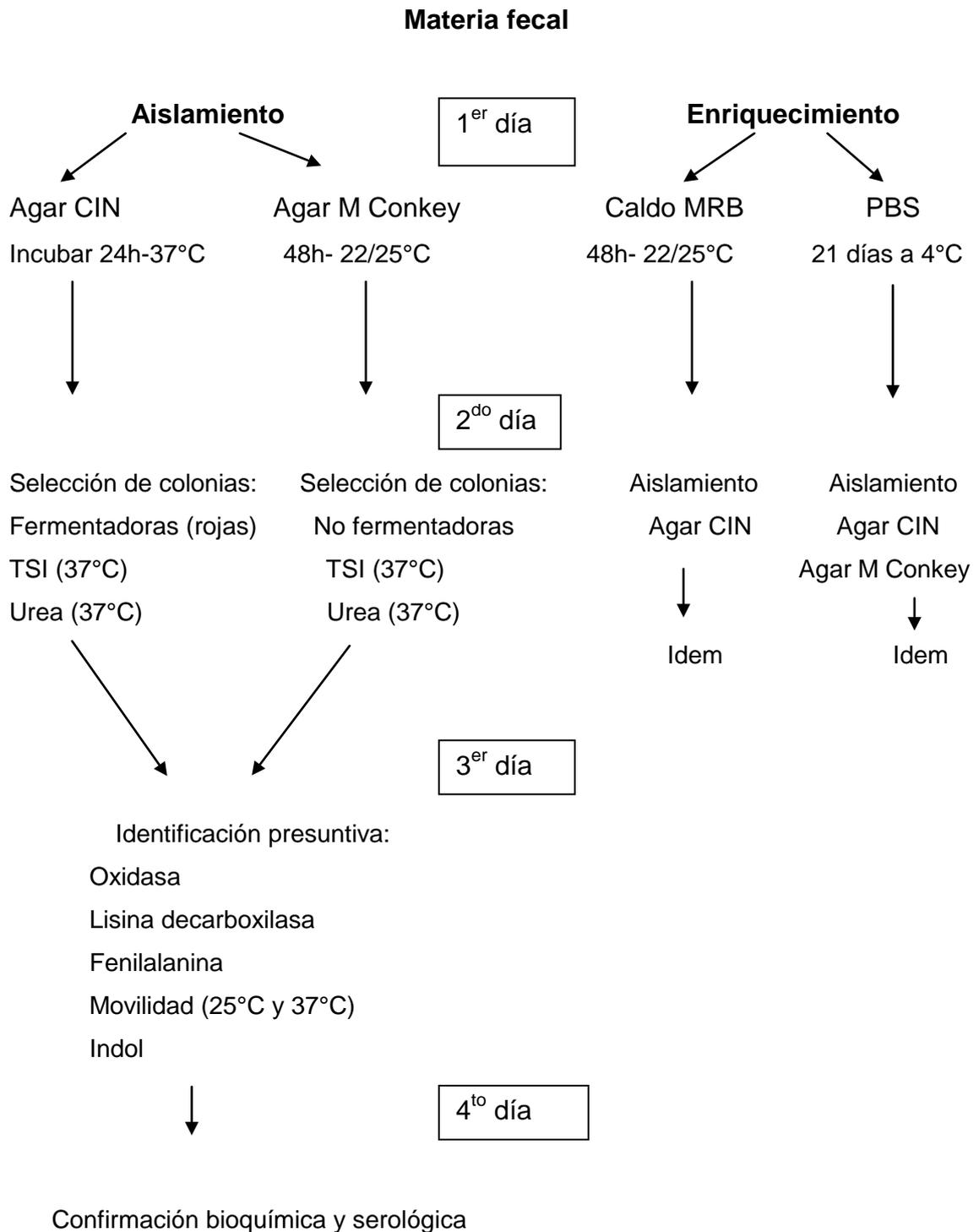
ESQUEMA DE AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE *E. coli* enterohemorrágica

1º DIA	<p>Siembra de la muestra en medio poco selectivo Agar MacConkey-sorbitol</p>  <p>Incubar 24h a 35-37°C</p>
2º DIA	<p>Selección de 7-8 colonias NO fermentadoras de sorbitol.</p>  <p>Siembra de agar nutritivo y citrato</p> <p>Incubar 24h a 35-37°C</p>
3º DIA	 <p>Serología de <i>E.coli</i> enterohemorrágica</p>
4º DIA	<p>Confirmación bioquímica</p> <p>Marcha bioquímica (IMViC)</p> 

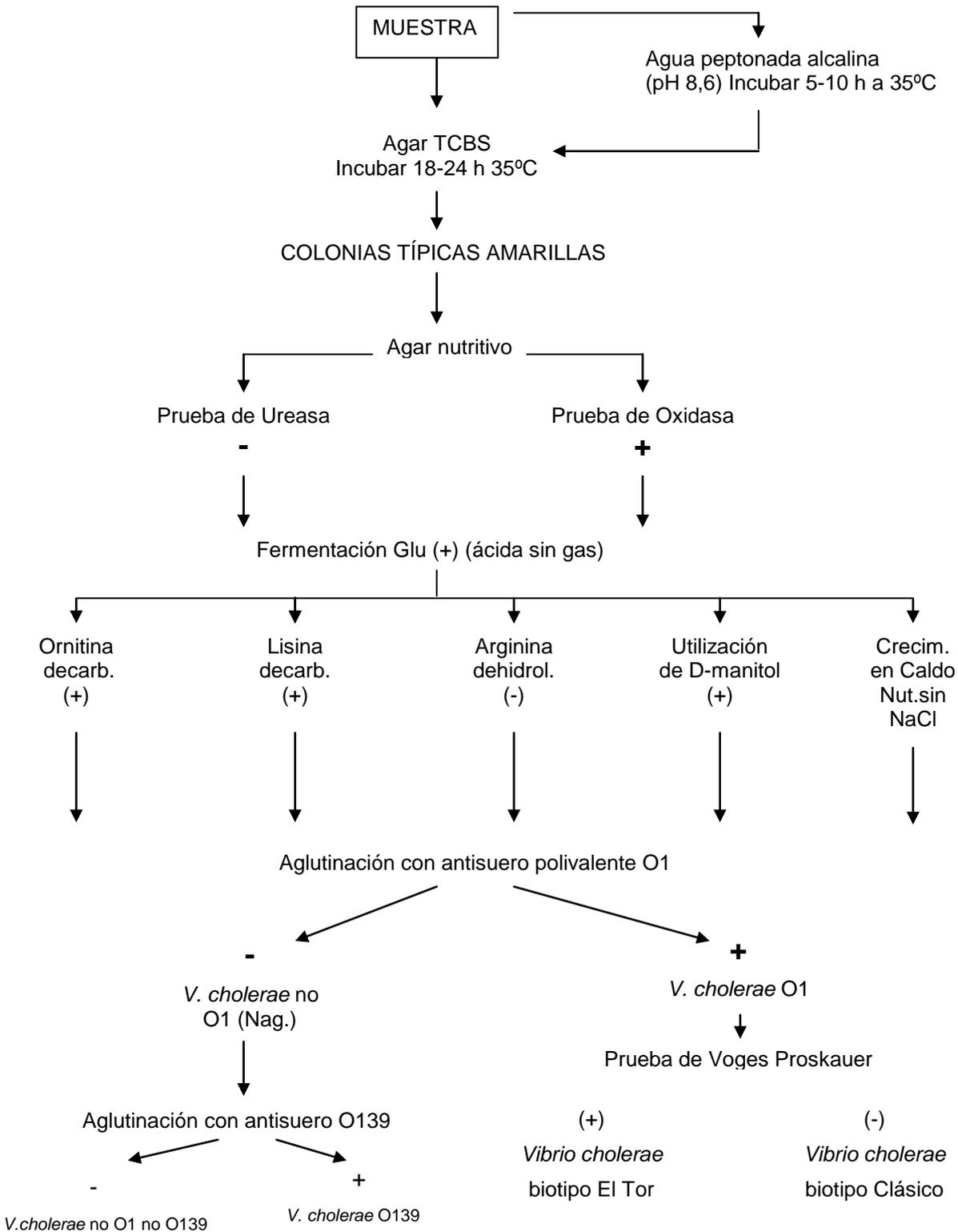
ESQUEMA PARA AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE *Salmonella* y *Shigella*

	AISLAMIENTO	ENRIQUECIMIENTO
1º DIA	 <p>Siembra de la muestra en SS y/o EMB</p> <p>Incubar 24-48 h a 35-37°C</p>	 <p>Siembra de la muestra en Caldo selenito o Caldo tetracionato</p> <p>Incubar 12h a 35-37°C</p>
2º DIA	<p>Selección de colonias no fermentadoras</p>  <p>Siembra de TSI y LIA</p> <p>Incubar 24h a 35-37°C</p>	 <p>Siembra de la muestra en SS y/o EMB</p> <p>Incubar 24-48 h a 35-37°C</p>
3º DIA	 <p>Marcha bioquímica y agar nutritivo</p> <p>Incubar 24h a 35-37°C</p>	<p>Selección de colonias no fermentadoras</p> <p>Siembra de TSI y LIA</p>  <p>Incubar 24h a 35-37°C</p>
4º DIA	 <p>Confirmación bioquímica y serológica</p>	 <p>Marcha bioquímica y agar nutritivo</p> <p>Incubar 24h a 35-37°C</p>
5º DIA		 <p>Confirmación bioquímica y serológica</p>

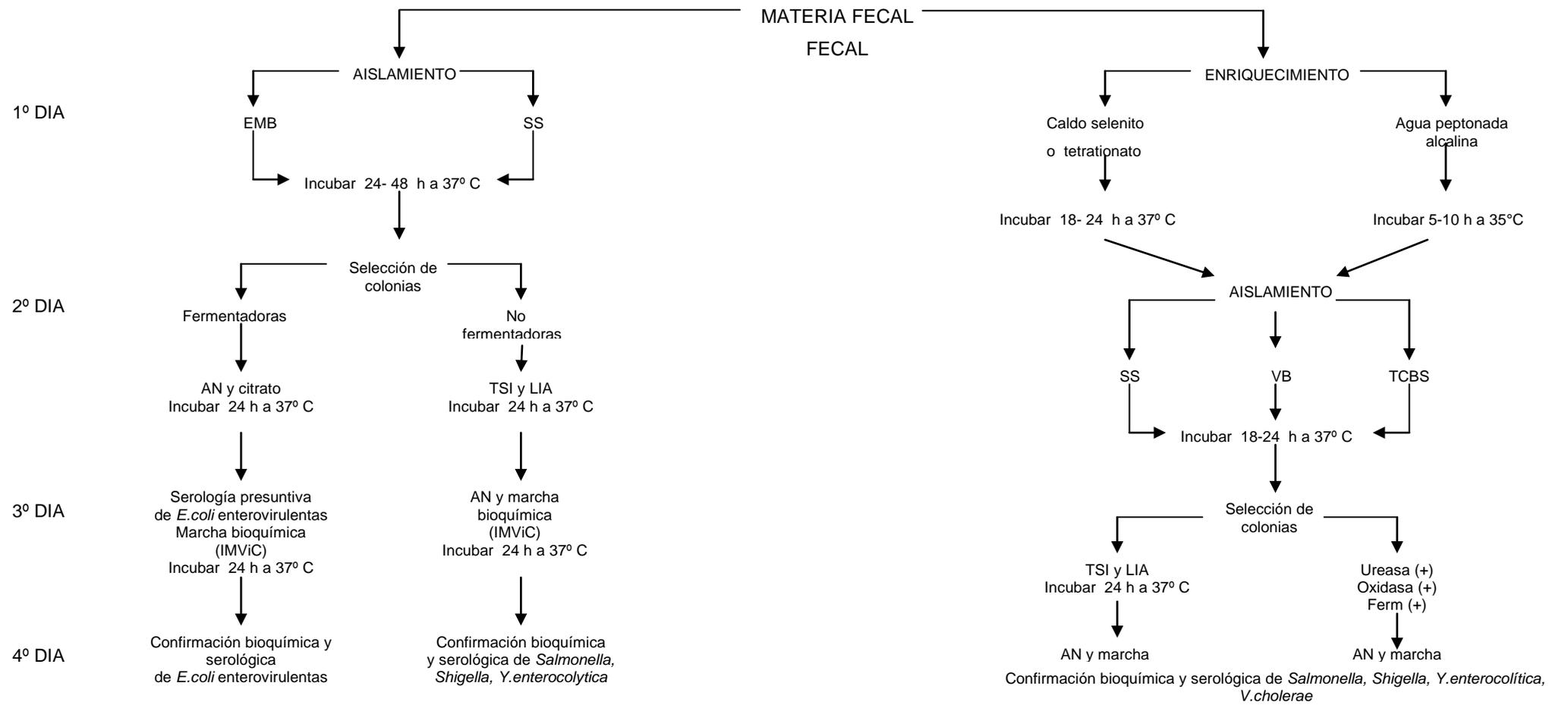
ESQUEMA PARA AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE *Yersinia enterocolítica*



ESQUEMA DE AISLAMIENTO Y TIPIFICACIÓN DE *Vibrio cholerae*



MARCHA GENERAL PARA COPROCULTIVO



TCBS: Agar tiosulfato sales biliares, sacarosa

LIA: Lisina hierro agar

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Realizar la observación macroscópica y microscópica de las muestras de materia fecal.
- Sembrar las muestras en medios de enriquecimiento y aislamiento.
- Identificar taxonómicamente, mediante pruebas bioquímicas y serológicas las bacterias productoras de diarrea.
- Integrar la marcha bacteriana realizada.

BIBLIOGRAFÍA

- Manual de Procedimientos. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina shiga O157 y no O157 en alimentos por separación inmunomagnética y PCR. 2006.
- Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. Rivas M., Miliwebsky Chinen E., Deza N, Leotta G. Medicina. Buenos Aires. 2006; 66 (3)27-32.
- Prats G. Microbiología Clínica. Cap. 15. Enteritis. 2005. Ed. Médica Panamericana. España.
- Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. Cap.32 *Vibrio* y *Aeromonas*. Microbiología médica. Elsevier, España. 2006.
- Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. Cap.33 *Campylobacter* y *Helicobacter*. Microbiología médica. Elsevier, España. 2006.
- Laciari A, Alcaráz L, Puig O, Abdón AM, Satorres S, Mattana C, Vega A, Centorbi H, Vaca L. Aliandro O. Bacterias de Interés en la salud pública regional. Cap. 5 *Campylobacter*. Categoría: Microbiología. Editorial Académica Española (EAE). 2012.
- Aislamiento, identificación, caracterización y pruebas de sensibilidad a antimicrobianos de *Vibrio cholerae*. Instituto Nacional de enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos. G. Malbrán". 2010.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 3

INFECCIONES URINARIAS. UROCULTIVO

OBJETIVOS

- Adquirir conocimiento de la microbiota habitual en las distintas porciones del aparato urinario y reconocer los agentes etiológicos más comunes de las infecciones urinarias.
- Adquirir conocimientos pertinentes a fin de optimizar la toma de muestra en diferentes circunstancias y tipo de paciente.
- Desarrollar idoneidad en la generación de un informe confiable en base a los resultados obtenidos.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La infección urinaria (IU) es una de las infecciones más frecuentes, que puede afectar tanto a pacientes internados como ambulatorios. Esta patología se presenta en niños y adultos, alcanzando su mayor prevalencia en mujeres, por la cercanía de la uretra con vagina e intestino y en cualquier enfermo con factores urológicos predisponentes.

En pediatría, la IU tiene una connotación muy especial en los casos mal diagnosticados o sin tratamiento adecuado, puesto que es un factor desencadenante de cicatrices renales que pueden conducir a insuficiencia renal.

Las infecciones del tracto urinario están causadas en su mayoría por bacterias intestinales, que ascendiendo por la uretra, alcanzan la vejiga urinaria y en algunos casos progresan afectando a los uréteres y riñones. La cistitis da lugar a un síndrome caracterizado por micción dolorosa y frecuente (disuria y polaquiuria) con sensación continua de necesidad de orinar (tenesmo) y escasa sintomatología general. Las infecciones que afectan a los uréteres y riñones (pielonefritis) se manifiestan por fiebre, dolor lumbar y afectación del estado general, asociadas a disuria, polaquiuria y tenesmo urinario cuando existe una cistitis concomitante.

Cuando hay IU, en la orina además de bacterias (bacteriuria), como respuesta a la infección hay leucocitos (piuria) por lo que su aspecto es generalmente turbio y con frecuencia maloliente.

Factores que favorecen o facilitan la IU

- a) Anormalidad funcional y/o estructural en riñón, uréteres, vejiga y uretra.
- b) Susceptibilidad del paciente debido a: Leucopenia, agranulocitosis agamaglobulinemia, anemias, lesiones orgánicas, etc.
- c) Virulencia de la bacteria.
- d) Trastornos circulatorios que favorecen la localización de las bacterias en vejiga, (urodinamia).
- e) Trastornos de tipo obstructivo por malformación congénita en vías urinarias: estrechez uretral y meato, fimosis, reflujo uretral.
- f) Vaciamiento incompleto de la vejiga en el momento de orinar.

La orina es un excelente medio de cultivo para los gérmenes patógenos o potencialmente patógenos que invaden el tracto urinario y cuando las bacterias pasan a la orina, se multiplican en forma extraordinaria superando a veces el millón por ml.

Las vías urinarias se pueden dividir en:

- a) Vías urinarias altas que comprende riñón y uréteres.
- b) Vías urinarias bajas que comprende vejiga y uretra.

Tanto riñón como uréteres y vejiga son estériles y la orina en vejiga es estéril, pero al pasar por uretra arrastra la flora que es propia de ésta.

Microbiota normal del aparato urinario**- Uretra anterior**

- *Staphylococcus epidermidis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Micrococcus* sp.
- *Streptococcus* sp.
- *Bacteroides* sp.
- *Mycoplasma* sp.

- Zona prepucial

Además de los anteriores

- Enterobacterias
- Distintas especies de anaerobios
- *Mycobacterium smegmatis*

- Zona vulvo-vaginal

- Niñas de corta edad: enterobacterias
- *Lactobacilos* sp.

- *Streptococcus* tipo D
- *Corynebacterium* sp.
- *Staphylococcus epidermidis*
- Bacteroides
- Mujeres post-menopáusicas y embarazadas
 - Disminución de lactobacilos y aumento de los restantes.
- Contaminación fecal en lactantes
 - *E. coli*
 - *Proteus*
 - *Enterobacter*
 - *Klebsiella*
 - *Enterococos*

Mecanismo de las Infecciones Urinarias

Existen tres vías o mecanismos:

1) Vía ascendente: las bacterias de uretra y las que llegan a ella debido a la proximidad con la zona del ano, penetran hasta vejiga y, desde allí, por los uréteres hasta el riñón. Esta es la vía más común y la siguen por lo general las Enterobacterias. Existe una relación entre los gérmenes intestinales y los agentes etiológicos de IU.

2) Vía hemática: el foco infeccioso o séptico se encuentra lejos de riñón (oído, pulmón, etc.). El ejemplo clásico es la tuberculosis renal. El bacilo de Koch se encuentra en pulmón y en un determinado momento de la enfermedad pasa a sangre y ésta lo transporta a riñón, donde, dependiendo del estado inmunitario del paciente se instala o no.

3) Vía linfática: la infección se produce porque ocurre una anastomosis de vasos linfáticos intestinales con los renales: síndrome enterorrenal. Este mecanismo de IU lo siguen también las Enterobacterias y *Enterococcus faecalis*.

Agentes etiológicos más comunes de IU

El 97% de las IU son monomicrobianas, es decir el agente etiológico es uno solo, y en solamente un 3% las IU son polimicrobianas.

Las bacterias Gram negativas en especial las Enterobacterias son los agentes etiológicos más frecuentes de IU, ocupando *E. coli* el primer lugar, seguida por otras enterobacterias tales como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia* y

enterococos. Aunque poco frecuente, es característica la infección por *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* en la mujer joven sexualmente activa.

En pacientes hospitalizados, con enfermedad de base obstructiva, sometidos a manipulaciones instrumentales y con tratamiento antibiótico, el porcentaje de *E. coli* disminuye y prevalecen otras bacterias como: *Enterobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* sp.

Conceptos a tener en cuenta:

Bacteriuria: Presencia de bacterias en la orina.

Bacteriuria significativa: Abundante cantidad de bacterias en orina o recuento mayor o igual a 100000 ufc/ml. Teniendo en cuenta la sintomatología y antecedentes clínicos un recuento de 1000-10000 ufc/ml puede también considerarse una bacteriuria significativa. Además debe considerarse significativo cualquier número de bacterias si la orina se ha obtenido por punción suprapúbica o renal.

Bacteriuria no significativa: Recuento de bacterias en orina menor a 1000 ufc/ml.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE ORINA

1- Niños y adultos que controlan esfínteres

La muestra de elección es el chorro medio miccional. El tiempo de retención deseado es de, por lo menos, 3 horas.

Mujeres: se debe higienizar la zona genital con agua y jabón, de adelante hacia atrás, secar con toalla limpia, y se debe colocar un tapón vaginal (torunda de gasa o algodón.) Se elimina el primer chorro y se recolecta en frasco estéril la fracción siguiente. Se recomienda orinar separando los labios mayores.

Hombres: se debe retraer el prepucio e higienizar el glande y surco balanoprepucial con agua y jabón, y secar con toalla limpia. Se elimina el primer chorro y se recolecta en frasco estéril la fracción siguiente. Se desaconseja el uso de antisépticos, ya que pueden afectar el resultado del urocultivo, provocando un descenso en el recuento de colonias.

2- Niños y adultos que no controlan esfínteres

Nunca utilizar bolsas colectoras para el estudio de urocultivo. Existen, al menos, tres alternativas. Recordar que la mayoría de estas muestras no cumplen con el tiempo de retención deseado. Se recomienda alguno de los siguientes procedimientos:

a- **Al acecho:** el método se aplica con los lactantes y es similar al descrito para los pacientes que controlan esfínteres. La dificultad estriba en que se desconoce cual será el momento en que se va a producir la micción. El operador deberá esperar entonces a que la misma se produzca y recogerá en un frasco estéril lo que seguramente será la porción media del chorro miccional.

b- **Punción suprapúbica:** este procedimiento deberá ser efectuado por médicos entrenados. En principio, se reserva para casos especiales, como neonatos graves, pacientes cuyos urocultivos previos presenten resultados conflictivos, sospecha de microorganismos de difícil desarrollo, etc. Primeramente se verifica que el paciente presente globo vesical palpable, se desinfecta zona pubiana con alcohol yodado y se deja actuar 1 min., se limpia con alcohol 70% y se punza con aguja adecuada en la zona ubicada 1 o 2 cm encima del pubis. Se aspira la orina y se vuelca en frasco estéril.

c- **Cateterización:** se utiliza en pacientes en los que habitualmente se practica el cateterismo intermitente (enfermos con vejiga neurogénica). En algunos centros lo utilizan para lactantes en lugar de la toma al acecho, ya que presenta la ventaja de ser una toma más rápida y confiable cuando se realiza por personal entrenado. Sin embargo, presenta el riesgo de producir el ascenso de los microorganismos desde la uretra a la vejiga y generar así una IU iatrogénica. Para efectuar este método se desinfecta la zona perineal, se introduce la sonda por la uretra y se recoge la porción media del chorro de orina que sale por la sonda. Del mismo modo pueden obtenerse muestras a partir de ureterostomías, nefrostomías o vesicostomías. La diferencia puede radicar en que los catéteres a utilizar podrían ser de menor diámetro. En estos casos, se deja fluir la orina retenida en la boca del conducto, se limpia la misma con un hisopo humedecido en alcohol, se introduce el catéter en el conducto y se permite el drenaje de la orina al exterior. La parte media del chorro se recoge en un recipiente estéril.

3- Enfermos sondados

Nunca tomar la orina que fluye del extremo distal de una sonda que no es nueva (recién colocada).

- a- **Punción de la sonda:** este procedimiento se utiliza en aquellos enfermos con sonda permanente en los que no es posible retirar o reemplazar la sonda. Se obtura la sonda con una pinza "ad hoc". Se espera unos minutos, se desinfecta la parte externa de la sonda en la zona proximal con alcohol yodado y se punza la sonda con aguja y jeringa estéril. Se vuelca el contenido en forma aséptica en un frasco estéril.
- b- **Recolección a través de una sonda estéril recién colocada:** se recoge directamente la orina que fluye por el extremo distal de la sonda nueva en un frasco estéril. Si se trata de un recambio de sonda, es importante considerar la posibilidad que se produzca la resuspensión de bacterias de la zona uretral en la orina vesical. Esto puede resultar en la presencia transitoria de bacterias en la orina y dar lugar a cultivos falsamente positivos. En estos casos, es recomendable una nueva muestra por punción de la sonda al día siguiente.

Conservación de la muestra

La muestra para urocultivo debe refrigerarse a 4-8°C (heladera) inmediatamente después de recolectada. Si el traslado al laboratorio demora más de 15 min, debe transportarse el frasco dentro de un contenedor con hielo.

PROCESAMIENTO DE LA ORINA

Determinaciones que ayudan al diagnóstico de la IU:

Examen microscópico del sedimento en fresco: es de utilidad para observar la presencia de bacterias, leucocitos, hematíes, cilindros, cristales, etc.

Se efectúa sobre el sedimento de un volumen de 10 ml de orina previamente mezclada y centrifugada a 2000 rpm durante 10 min. Se coloca una gota entre porta y cubre y se observa con objetivo de 400 X.

- **Leucocitos:** normalmente hay 3-4 por campo. Un aumento de leucocitos indica inflamación.
- **Hematíes:** un sedimento normal presenta 2-3 por campo. Si están aumentados indica lesiones renales.
- **Cilindros:** la presencia de cilindros es sinónimo de proteinuria, dado que el papel de la albúmina es preponderante en su formación.
- **Cristales:** Los cristales presentes en la orina pueden ser un componente normal o bien metabolito anormal dependiendo de su naturaleza.

Cultivo-Siembra

La siembra debe realizarse de la orina sin centrifugar con un ansa calibrada (5µl), lo que permitirá obtener una estimación semicuantitativa del desarrollo microbiano (Técnica del ansa calibrada). Existen numerosos medios de cultivo para sembrar una muestra de orina. La elección del medio de cultivo debe contemplar la relación costo-beneficio, de modo de elegir la opción que permita la recuperación de la mayoría de los patógenos con el menor costo posible.

En Argentina se ha estandarizado el empleo de los siguientes medios: Agar CLDE (Cistina-Lactosa- Deficiente en Electrolitos) y Agar sangre que se incuban durante 18 a 24 h a 37°C. En caso de tener cultivos negativos a las 24 h, se deben incubar 24-48 h más.

Técnica del ansa calibrada:

Agitar la orina, cargar el ansa de 5 µl y sembrar en media placa de CLDE y media placa de agar sangre tres estrías sin recargar el ansa. Incubar 18-24 h a 37°C.

Realizar el recuento semicuantitativo de colonias considerando:

Crecimiento en la primera estría: 10^3 ufc/ml

Crecimiento hasta la segunda estría: 10^4 ufc/ml

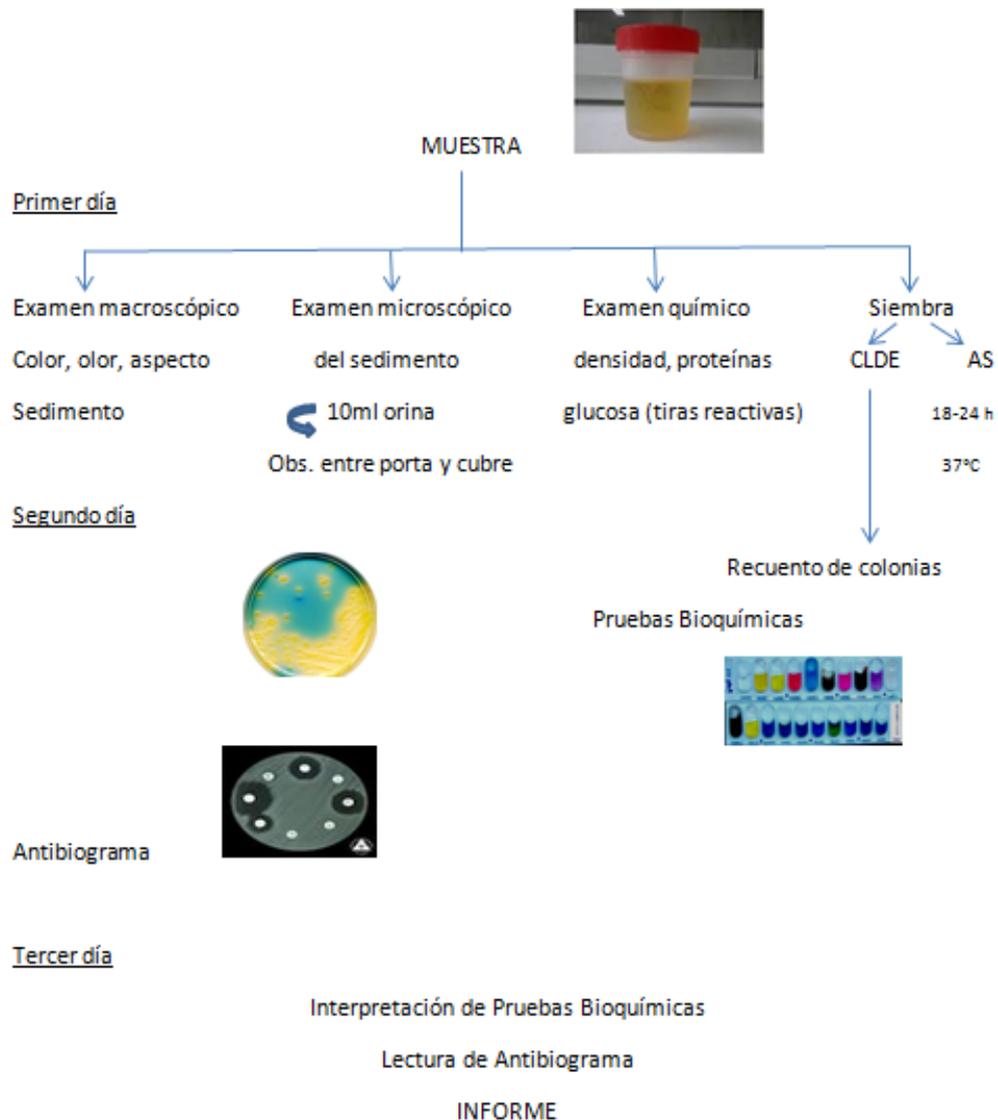
Crecimiento hasta la tercer estría: $\geq 10^5$ ufc/ml

Hace unos años se daba gran importancia al recuento de las bacterias en la orina para interpretar el significado de un cultivo, considerándose significativos los recuentos de $\geq 10^5$ ufc/ml. En la actualidad, la evaluación de los recuentos se efectúan en función del método de toma de la orina, de la existencia de sonda permanente, de la presencia de factores predisponentes, de la sintomatología clínica del paciente, de la existencia de piuria, del tipo de microorganismo y del grado de contaminación de la orina definida por el examen microscópico del sedimento. En las orinas bien tomadas de pacientes con piuria y/o sintomatología clínica, se aceptan como significativos los recuentos de $\geq 10^3$ ufc/ml.

Las bacterias aisladas deben identificarse mediante pruebas bioquímicas y debe también estudiarse su sensibilidad a los antimicrobianos.

Las pruebas serológicas **no** se emplean para el diagnóstico de las infecciones urinarias.

MARCHA GENERAL PARA UROCULTIVO



ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Observar macroscópicamente las muestras de orina (color, aspecto sedimento).
- Agitar las orinas y sembrar por la técnica del ansa calibrada en media placa de agar CLDE y media placa de agar sangre. Incubar 18 a 24 h a 37°C.
- Transvasar 8-10 ml de orina en tubo de centrífuga y utilizando tiras reactivas realizar el examen químico de las mismas.
- Luego de la incubación, identificar taxonómicamente, mediante pruebas bioquímicas, las bacterias aisladas de las muestras de orina analizadas.
- Observar e interpretar antibiogramas.

-Integrar la marcha bacteriana realizada.

BIBLIOGRAFÍA

-Infecciones urinarias. 2005. Microbiología Clínica. Prats G. Ed. Médica Panamericana.España.

-ECHEVARRIA-ZARATE, J., SARMIENTO AGUILAR, E., OSORES-PLERGE, F. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. Acta Méd. Peruana. 2006, vol.23, no.1, p.26-31. ISSN 1728-5917.

- CAMPS, E., PERAZZI, B. 2008. Experiencia de educación continua basada en la notificación voluntaria de urocultivos y antibiogramas. Acta Bioquím. Clín. Latinoam., La Plata, v. 42, n. 2.

- ANDREU DA., CACHO J., COIRA NIETO A., LEPE JIMÉNEZ JA. 2010. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. 2a ed. (14a) Eds: Cercenado E, Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº4

BACILOS NEGATIVOS NO FERMENTADORES (BNNF). *PSEUDOMONAS*

OBJETIVOS

- Reconocer las características diferenciales de los géneros comprendidos en el grupo BNNF y su importancia en las infecciones intrahospitalarias y pacientes inmunocomprometidos.
- Aislar e identificar taxonómicamente mediante pruebas bioquímicas *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCION TEÓRICA

Los bacilos Gram negativos que **no fermentan** la glucosa (BNNF), constituyen aproximadamente el 15% de todos los aislamientos que se efectúan en los laboratorios de microbiología clínica.

Este grupo heterólogo, aunque cuantitativamente minoritario, tiene interés por su papel en las infecciones hospitalarias y su frecuente resistencia a los agentes antimicrobianos. Son microorganismos poco exigentes y muchos desarrollan mejor a temperatura ambiente.

Los BNNF comprenden una diversidad de géneros y especies no muy frecuentes y difíciles de identificar en un laboratorio de rutina ya que son inertes a pruebas bioquímicas comunes. Algunos han sido reclasificados taxonómicamente con la aplicación de nuevas técnicas de biología molecular. Los géneros de mayor importancia clínica son:

Pseudomonas

Acinetobacter

Moraxella

Alcaligenes

Achromobacter

Miroydes

Shewanella putrefaciens (*Pseudomonas putrefaciens*)

Chryseobacterium meningosepticum (*Flavobacterium meningosepticum*)

Empedobacter brevis (*Flavobacterium breve*)

(): nomenclatura anterior

Pseudomonas

La descripción original del género *Pseudomonas* incluyó una amplia variedad de bacilos Gram negativos. En la actualidad, el género se dividió basándose en la homología del ARN ribosómico. Recientes estudios y con el uso de técnicas de biología molecular se han designado 5 grupos:

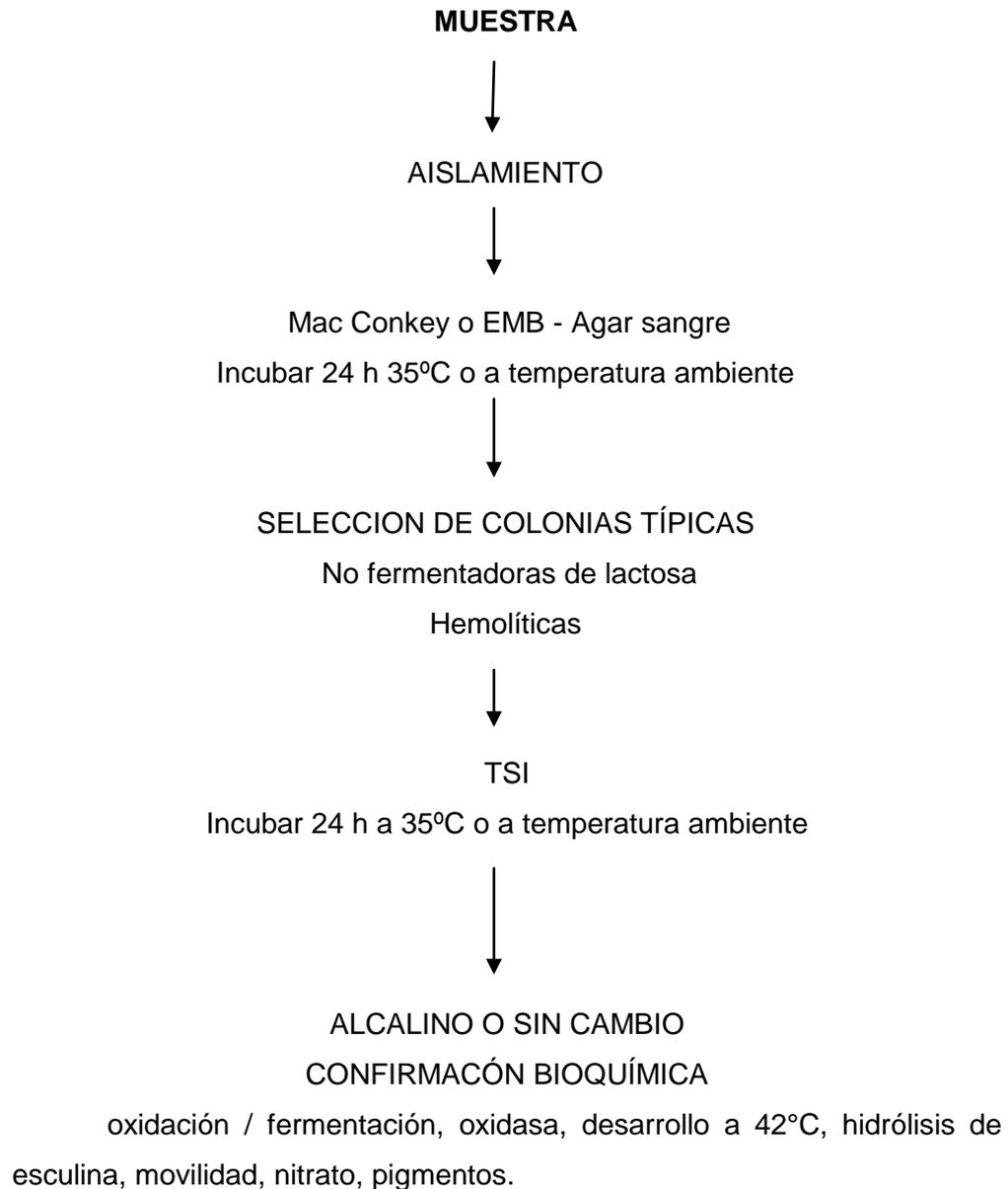
Grupo	Designación actual	Designación antigua
I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	<i>Pseudomonas putida</i>	
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	
II	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>
	<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Pseudomonas gladioli</i>
	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Pseudomonas mallei</i>
	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Pseudomonas (Burkholderia) pickettii</i>
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
III	<i>Comamonas acidovorans</i>	<i>Pseudomonas acidovorans</i>
	<i>Comamonas testosteroni</i>	<i>Pseudomonas testosteroni</i>
	<i>Acidovorax delafieldii</i>	<i>Pseudomonas delafieldii</i>
	<i>Acidovorax facilis</i>	<i>Hidrogenomonas facilis</i>
IV	<i>Brevundimonas diminuta</i>	<i>Pseudomonas diminuta</i>
	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Pseudomonas vesicularis</i>
V	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas(Xanthomonas)</i>
	<i>Stenotrophomonas africana</i>	<i>maltophilia</i>

Pseudomonas aeruginosa es el BNNF más comúnmente aislado en la clínica y él más fácil de identificar por la presencia de pigmentos fluorescentes y prueba de la oxidasa positiva. Se diferencia de *P. fluorescens* y *P.putida* por el desarrollo a 42°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cronograma de estudio de caracteres primarios

Los medios primarios para el aislamiento de BNNF dependen de la fuente de la muestra, pero deben incluir un medio de agar sangre y un medio entérico selectivo, como el Mac Conkey o EMB.



INTERPRETACION DE RESULTADOS

	O/F	Oxi	42°C	Cetri	SH ₂	Esc	Mov	Nit	F	L	N ₂
<i>P. aeruginosa</i>	A/N	+	+	+	-	-	+	+/-	+	-	+/-
<i>P. fluorescens</i>	A/N	+	-	+	-	-	+	-/+	+	-/+	-
<i>P. putida</i>	A/N	+	-	+	-	-	+	-	+	-/+	-
<i>P. stutzeri</i>	A/N	+	+/-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>B. cepacia</i>	A/N	+/d	+/-	+/-	-	+/-	+	-/+	-	(+)	-
<i>S. maltophilia</i>	A/N	-	-/+	-	-	+	+	-/+	-	-	-
<i>S. putrefaciens</i>	A/N	+	+/-	-	+	-/+	+	+	-	-	-
<i>A. baumannii</i>	A/N	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. lwoffii</i>	N/N	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Moraxella sp</i>	N/N	+	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-

() tardío

MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Medio de King Ward y Raney (para los pigmentos piocianina y pioverdina)

King A (piocianina)

Bacto peptona	2 g
Bacto agar	1,5 g
Glicerol .	1,0 g
Sulfato de potasio anhidro	1,0 g
Cloruro de magnesio	0,14 g
A.D	100 ml

pH 7,2.

Esterilizar a 115°C durante 20 min. A las 24-48 h se extrae el pigmento por el agregado de amoníaco para alcalinizar y cloroformo. Si hay piocianina el cloroformo se torna celeste o azul.

King B (pioverdina)

Proteosa peptona	2 g
Bacto agar	1,5 g
Glicerol	1,0 g
Fosfato monoácido de potasio anhidro	0,15 g
SO ₄ Mg.7H ₂ O	0,15 g
A.D	100 ml

pH 7,2

Esterilizar a 115°C durante 20 min. A las 24 h se observa una pigmentación verde claro que da fluorescencia a la lámpara de Wood.

Prueba de oxidasa (Gaby y Hadley)

Se basa en que *Pseudomonas aeruginosa* contiene en abundancia citocromo-oxidasa. Esta enzima, también llamada indofenoloxidasa, citocromooxidasa, etc., oxida la dimetilparafenilendiamina en presencia de oxígeno y citocromo c, dando lugar a la formación de indofenol (azul).

Discos de oxidasa

Discos de papel, conteniendo oxalato de paraaminodimetilanilina, droga utilizada para detectar la producción de citocromo oxidasa.

Técnica:

En un tubo de hemólisis, preparar una suspensión densa del germen en estudio en 0,2 ml de agua destilada. Colocar un disco del reactivo, rápidamente se producirá un color rosado que se intensificará hacia el fucsia, cuando la reacción es positiva. Esto ocurre en forma inmediata. Una reacción lenta (más de 2 min) debe ser considerada negativa.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

-Sembrar una cepa pura de *Pseudomonas aeruginosa* en agar sangre y agar EMB. Incubación a 37°C 24-48 h.

-Identificación taxonómica mediante pruebas bioquímicas: oxidasa, Hugh-Leifson(O/F), TSI, King A y King B.

BIBLIOGRAFÍA

- Infecciones oportunistas. 2005. Microbiología Clínica. Prats G. Ed. Médica Panamericana. España.
- Infecciones por *Pseudomonas*. Martinez L, Garcia L, Alemany G. Tratado SEMIC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Médica panamericana. España. 2006.
- Pseudomonas* y microorganismos relacionados. Microbiología Médica. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Elsevier. España. 2006.
- Infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. María Carmen Fariñas, Luis Martínez-Martínez. Vol 31:6, 2013.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°5

INFECCIONES GENITALES

OBJETIVOS

- Conocer la composición y mecanismos de regulación de la microbiota habitual vaginal.
- Identificar los microorganismos más comúnmente involucrados en las distintas patologías gineco-obstétricas.
- Conocer la composición de la microbiota habitual de la uretra masculina y los patógenos causantes de las distintas patologías andrológicas.
- Alcanzar los conocimientos necesarios para poder decidir, en distintas situaciones clínicas, que muestras son apropiadas y cómo realizar su procesamiento.
- Aplicar criterios adecuados, en la interpretación de los resultados obtenidos y en la generación del informe correspondiente.

INTRODUCCION TEÓRICA

Composición de la microbiota vaginal habitual

- **Perinatal:** las niñas cuando nacen por vía vaginal adquieren rápidamente la microbiota materna, no solamente por colonización genital directa, sino también por vía gastrointestinal al deglutir secreciones y con el inicio de la lactancia. La composición de la microbiota genital neonatal es similar a la que se observa en mujeres en edad reproductiva debido a los niveles estrogénicos elevados, por transferencia intra útero materna. Paulatinamente al descender los niveles estrogénicos al cabo de un mes de vida, el pH vaginal asciende hasta llegar al pH 6-7, habitual en la primera y segunda infancia.
- **Lactantes y niñas hasta la menarca:** en este período se establecen en la vagina los microorganismos que integran la microbiota vulvar y de la piel. La carencia estrogénica, el pH elevado, limitan la colonización con *Lactobacillus* spp., y por el contrario facilitan la presencia de Enterobacterias, *Staphylococcus* spp., anaerobios, etc. Destaquemos que dentro de estos últimos, suele recuperarse *Veillonella* spp., diplococo Gram negativo, morfológicamente similar a *N. gonorrhoeae*. Si sólo se toma en cuenta la observación microscópica para estudiar una secreción proveniente de una niña, podrían cometerse severos errores de interpretación, con implicancias médico legales.
- **Menarca:** Ya en la perimenarca los cambios hormonales, a veces bruscos, facilitan una masiva colonización por *Lactobacillus* spp., que suele llevar a una gran descamación

celular, y muchas veces asociada a una abundante secreción. Esta circunstancia motiva la consulta y si no se consideran los factores mencionados y la etiología probable, se llega a un tratamiento antimicrobiano empírico, totalmente innecesario. Es común observar en este período, infecciones por *Candida* spp., que no es más que la traducción de los cambios mencionados (los estrógenos facilitan la expresión de los factores de virulencia de *Candida*) y el establecimiento de la flora de la mujer adulta.

- **Edad reproductiva:** Los estrógenos favorecen el depósito de glucógeno, que constituye el sustrato para el crecimiento de los lactobacilos en el epitelio vaginal. Los lactobacilos producen ácido láctico a partir de un producto de la fermentación del glucógeno, la glucosa-6-fosfato, lo que a su vez mantiene bajo el pH vaginal (< 4.5) restringiendo de ese modo la flora a especies fundamentalmente ácido-tolerantes, como son las especies de *Lactobacillus* (ver mecanismo de acidogénesis). La acción estrogénica favorece el incremento de *Lactobacillus* spp. y el descenso de la flora anaerobia con excepción de especies anaerobias de *Lactobacillus*. También la exposición del epitelio vaginal al líquido seminal, que presenta un pH elevado, una alta concentración de zinc y una concentración elevada de fructosa, y a veces contiene microorganismos, puede tener al menos un efecto transitorio sobre la ecología de la vagina.
- **Posmenopausia:** En la mujer posmenopáusica, la microbiota es muy variable dependiendo de la funcionalidad del ovario durante esta etapa y a las alteraciones estructurales anatómicas frecuentes. En la mujer anciana, las vaginitis tienden a acentuar aún más la atrofia epitelial, condicionando recurrencias y reinfecciones generalmente con microorganismos endógenos de baja virulencia. La diferencia más significativa entre la mujer pos y premenopáusica es el incremento de la incidencia de bacilos gram negativos aerobios diferentes de *Escherichia coli* en el primer grupo.
- **Puerperio:** En el posparto, la microbiota vaginal sufre cambios drásticos debido a la presencia de sangre y loquios que favorece el desarrollo de las bacterias anaerobias y enterobacterias, en detrimento de las especies de lactobacilos, en contraste con lo que ocurre durante el embarazo. Es por eso que este período suele ser crucial para el desencadenamiento y progreso de una infección del tracto genital superior.
- **Dispositivo intra-uterino (DIU):** La presencia de DIU origina modificaciones de tipo cuantitativo, debido principalmente al fenómeno inflamatorio que suele desencadenar a nivel cervical, la presencia del hilo. Esto representa un cierto riesgo para las portadoras de DIU si no se efectúan controles periódicos, ya que los microorganismos verían facilitado su ascenso al tracto genital superior con la posibilidad de desencadenar endometritis, enfermedad inflamatoria pélvica, etc. Uno de los microorganismos

implicados en las infecciones de las mujeres con DIU ha sido *Actinomyces israelii*, pero éste puede formar parte de la microbiota normal. La presencia de DIU favorecería la colonización en el endometrio y posterior infección si la permanencia del mismo se prolonga por más tiempo del aconsejable.

Clasificación

Podemos clasificar la microbiota vaginal de la siguiente manera:

- 1) Microbiota permanente: es la integrada por aquellos microorganismos endógenos que se recuperan durante todo el ciclo, en más del 90% de las mujeres (*Lactobacillus* spp., *Corynebacterium* spp.).
- 2) Microbiota esporádica o transitoria: es la integrada por aquellos microorganismos endógenos que varían en su concentración a lo largo del ciclo.
- 3) Microbiota intermitente: es la integrada por aquellos microorganismos endógenos que se recuperan cíclicamente.
- 4) Microbiota potencialmente patógena: es la integrada por aquellos microorganismos endógenos que, por algún tipo de desequilibrio, pueden desencadenar solos o asociados, alguna patología (*Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, anaerobios, *Mycoplasma* spp.)
- 5) Microbiota patógena: es la integrada por aquellos microorganismos exógenos que producen una patología determinada y que no forman parte de la flora habitual (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema palidum*).

Mecanismos de regulación:

- **Acidogénesis:** Muchas de las bacterias que integran la microbiota normal son homofermentativas y producen como metabolito final el ácido láctico sobre todo las especies de *Lactobacillus*. Estos actúan sobre la glucosa-6-fosfato proveniente del glucógeno liberado de la citólisis de las células intermedias. La presencia del ácido láctico determina que las cifras de pH en la mujer en edad reproductiva sea de 3,8 a 4,5.
- **Producción de H₂O₂:** Se comprobó que las especies de *Lactobacillus* provenientes de vaginas normales producen H₂O₂, mientras que una proporción importante provenientes de vaginas infectadas no lo hacen. El H₂O₂ limita la proliferación de especies bacterianas que no poseen catalasa.

Composición de la microflora habitual de la uretra masculina

La uretra masculina contiene microorganismos variados que, en general, son similares a los que se encuentran en la zona de la piel adyacente, particularmente en la

zona balanoprepucial. Entre los mismos podemos encontrar: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., enterobacterias, *Acinetobacter baumannii*, *Propionibacterium* spp., *Ureaplasma urealyticum*. A estos se sumarán otros que dependerán de los hábitos sexuales.

LAS INFECCIONES GENITALES SE CLASIFICAN EN:

- Exudados:
 - Cervicitis (*C.trachomatis*, *N.gonorrhoeae*)
 - Epididimitis (uropatógenos, *U.urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp., anaerobios)
 - Prostatitis (idem epididimitis)
 - Uretritis (*U. urealyticum*, *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*)
 - Vaginitis (*Candida* spp., *T. vaginalis*)
 - Vaginosis bacteriana (VB) (Complejo GAMB)
- Úlceras:
 - Sífilis (*Treponema pallidum*)
 - Chancro blando (*Haemophilus ducreyi*)
 - Linfogranuloma venéreo (*Chlamydia trachomatis* serotipos L1, L2 y L3)
 - Granuloma inguinal (*Calymmatobacterium granulomatis*)
 - Verrugas (*Molluscum contagiosum*)
 - Herpes (*Virus herpes simplex*)
 - Condiloma acuminado (HPV)

Patógenos relacionados con enfermedad neonatal: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Chlamydia trachomatis*, *Virus Herpes Simplex*, HIV, *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*.

Disfunción Vaginal (DV)

El desbalance de la microbiota vaginal es frecuente en la mujer en edad fértil, y en un 15 a 20 % de los casos ocasiona una disfunción vaginal (DV), que afecta la salud sexual y reproductiva. En el marco amplio del síndrome de la DV se incluyen patologías con características propias, como la vaginosis bacteriana (VB), la vaginitis microbiana inespecífica (VMI), la vulvovaginitis por levaduras (VVL) y la vulvovaginitis por *Trichomonas vaginalis* (VVT).

Vaginosis: La vaginosis bacteriana (VB) implica un desequilibrio en la microbiota vaginal en ausencia de reacción inflamatoria.

Vaginitis: La vaginitis implica un desequilibrio en la microbiota vaginal con reacción inflamatoria.

Estrategia del proyecto BACOVA

ESTADOS VAGINALES BÁSICOS

Al observarse reiteradamente la inconsistencia de las solicitudes de estudio generadas en el cuerpo médico y la falta total de guías de procedimientos consensuadas y puntuales para el estudio de la disfunción vaginal (DV) en la mujer en edad fértil, un grupo de consultores y basados en estudios pilotos estructuró el Manual de Procedimientos de BACOVA 2004, que es actualizado anualmente. BACOVA (Balance del Contenido Vaginal) no es una nueva metodología, integra criterios morfológicos fehacientemente demostrados internacionalmente, en un bloque de resultados que genera un informe predictivo completo.

El Balance del Contenido Vaginal o BACOVA es un estudio morfológico completo que incluye el análisis del contenido vaginal (CV) en fresco, por tinción de Gram y culmina con un estudio por coloración de Giemsa, con lo que se integra la exploración de todo el panorama biológico.

La base del informe la construyen dos números. Uno que refiere al estado de la microbiota vaginal *Valor Numérico o valor de Nugent* (VN) y el otro que interpreta el estado de *Respuesta Inflamatoria Vaginal* (RIV), mediante un único número entero, que indica la cantidad de leucocitos presente en el CV. En base al VN y la RIV, BACOVA establece cinco *Estados Vaginales Básicos* (EVBs), a partir de los cuales se construye la base del diagnóstico diferencial de las patologías vaginales más frecuentes, con el más alto valor predictivo (vaginosis /vaginitis).

Los 5 EVBs son:

1-EVB I: Microbiota normal

2-EVB II: Microbiota normal con Reacción Inflamatoria Vaginal (RIV) significativa

3-EVBIII: Microbiota Intermedia

4-EVB IV: Vaginosis Bacteriana

5-EVB V: Vaginitis Microbiana Inespecífica, mujer que tiene además de una alteración de la microbiota vaginal una RIV asociada.

BACOVA con el 100% de valor predictivo positivo y negativo, determina el diagnóstico diferencial del estado normal del CV (MN), el estado de vaginosis en su forma intermedia

(MI) y Vaginosis Bacteriana Típica (VB) y el de vaginitis en los Estados Vaginales Básicos II y V.

Con esta metodología se realiza un estudio morfológico integral del contenido vaginal. Se obtienen resultados que permiten el diagnóstico diferencial del estado normal del contenido vaginal, vaginosis bacteriana y vaginitis microbiana inespecífica con un valor de 100 % de valor predictivo positivo y negativo. Informa sobre la presencia de levaduras y/o *Trichomonas*. Contribuye como alerta de gran importancia clínica en el caso de detección de morfotipos bacterianos extraños y/o células epiteliales no habituales en el contenido vaginal.

Vaginosis Bacteriana (VB)

La vaginosis bacteriana (VB) implica un desequilibrio en la microbiota vaginal en ausencia de reacción inflamatoria. Se evidencia un desplazamiento de la microbiota lactobacilar habitual por microorganismos como: *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp, *Prevotella* spp, *Bacteroides* spp (Complejo GAMB).

Al desaparecer la acción protectora de la microbiota lactobacilar, disminuye la concentración de H₂O₂ y la tensión de oxígeno, favoreciendo la proliferación del complejo GAMB que está en la vagina en concentraciones generalmente no significativas.

Las descarboxilasas y aminopeptidasas de las bacterias anaerobias y *M. hominis* transforman los aminoácidos lisina, arginina y ornitina en aminas volátiles como trimetilamina, putrescina y cadaverina que son las responsables del olor fétido y del aumento del pH vaginal, dificultando cada vez más la proliferación de los lactobacilos. Ciertas enzimas como fosfolipasas y sialidasas, presentes en algunos anaerobios, pueden interferir con la cascada de las prostaglandinas a nivel del ácido araquidónico, aumentando así el riesgo de parto prematuro en la mujer embarazada.

Implicancias clínicas

La VB no se considera una infección de transmisión sexual (ITS). Además de vaginosis, el complejo GAMB está asociado a abortos del 2º trimestre de embarazo, parto prematuro, ruptura prematura de membranas, corioamnionitis, endometritis puerperal, EPI (enfermedad inflamatoria pélvica) e infección post-quirúrgica.

Las mujeres con esta patología presentan flujo abundante, maloliente, homogéneo y blanco grisáceo, distribuido sobre toda la pared vaginal (signo de la pincelada). Puede haber o no prurito, disuria, eritema o ardor vulvar, dispareunia, mal olor poscoital. El pH se encuentra elevado y el test de aminas suele dar positivo.

Tratamiento

El tratamiento de elección es metronidazol por vía oral ya que no bloquea la recolonización del epitelio por los lactobacilos. Se desaconseja el tratamiento de la pareja por tratarse de una infección endógena con una eficacia de transmisión extremadamente baja.

Vulvovaginitis por Levaduras (VVL) o Candidiasis Vulvovaginal (CVV)

Candida spp.

Candida spp es un hongo dimórfico que se encuentra en los humanos como microbiota habitual del tracto intestinal y genital en dos fases fenotípicas: 1. Blastosporo o levadura y 2. Forma germinativa (hifas y pseudohifas).

Parece haber un delicado equilibrio entre *Candida* spp, y los microorganismos que habitualmente forman parte de la flora cérvicovaginal y otros mecanismos de defensa del ecosistema vaginal. Los lactobacilos inhiben el desarrollo de *Candida* spp. A través de la interferencia bacteriana (competición por nutrientes, interferencia en el receptor de la célula epitelial, producción de bacteriocinas).

La candidiasis vulvovaginal (CVV) es causada por el sobrecrecimiento fúngico.

Manifestaciones clínicas

Los síntomas principales de la CVV son prurito, ardor vulvar, dispareunia y/o síntomas urinarios (disuria, poliaquiuria y tenesmo, recordar síndrome uretral femenino). Al examen físico se observa flujo variable con aspecto de leche cortada o ricota, blanco-grisáceo con o sin flóculos y sin fetidez. También suele observarse eritema y edema vulvar y/o vaginal. Los signos y síntomas son de máxima intensidad en el premenstruo inmediato.

En la balanitis o balanopostitis, la piel del glande está macerada, con placas blanquecinas, vesículas o pústulas y erosiones secundarias. En algunos pacientes, las lesiones se propagan al escroto y región inguinal e incluso pasan al interior de la uretra.

Epidemiología

El 85 a 90 % de las CVV se deben a *C. albicans*, el resto es debido a *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* y *C. subtropicalis*.

Factores predisponentes:

- a. Embarazo (los estrógenos incrementan la adherencia de *Candida* spp. al epitelio vaginal, como así también su virulencia)
- b. Anticonceptivos hormonales (razones idénticas al embarazo)

- c. Diabetes y otros desórdenes metabólicos
- d. Antimicrobianos (eliminan la microbiota protectora, que normalmente previene la germinación de *Candida* spp. y su invasión superficial)

Entre un 3 y un 10% de las parejas de mujeres con CVV presentan balanopostitis candidiásicas y las parejas sexuales de la mayoría de los hombres con balanopostitis presentan CVV. Sin embargo no se la considera una ETS, ya que el tratamiento de la pareja no previene la recolonización ni la recurrencia.

Tratamiento

Se dispone de numerosos esquemas terapéuticos posibles, tópicos y/u orales, principalmente a base de antifúngicos imidazólicos.

Vulvovaginitis por *Trichomonas* (VVT)

Trichomonas vaginalis

Es un protozooario cosmopolita, provisto de una gran movilidad debido a sus 4 flagelos y una membrana ondulante. Es de forma ovalada y mide en promedio 15 μm , siendo un poco mayor en tamaño que un leucocito. Crece bajo moderada anaerobiosis y a pH ácido. Es un organismo muy lábil y muere fácilmente ante la desecación o exposición prolongada a la luz solar.

Manifestaciones clínicas

En la mujer produce principalmente vaginitis, pero también se asocia, con menos frecuencia, a bartolinitis, enfermedad inflamatoria pélvica, infertilidad y aumento de riesgo de cáncer cervical. En la mujer embarazada puede ocasionar parto prematuro, ruptura prematura de membranas y corioamnionitis.

En el varón produce principalmente uretritis. Otras complicaciones asociadas a la trichomoniasis incluyen prostatitis, balanopostitis, epididimitis e infertilidad.

Son comunes las formas asintomáticas (hasta un 50% de las mujeres y un 90% de los varones).

En la mujer los síntomas más comunes son flujo vaginal abundante, prurito y/o disuria. El flujo vaginal espeso, amarillo-verdoso, espumoso y maloliente ha sido clásicamente asociado a la trichomoniasis, pero se presenta sólo en 10-30% de las pacientes. También suele observarse un aumento del pH vaginal y el test de aminas positivo, aspecto que comparte con la Vaginosis Bacteriana (VB). La colpitis macularis o "strawberry cervix" (cervix con aspecto de frutilla) es un signo patognomónico, pero

presente en tan sólo el 2% de las pacientes.

En el hombre, los síntomas más comunes, son exudado uretral abundante y purulento, disuria, prurito y ardor luego de acto sexual. La enfermedad suele tener un curso autolimitado (posiblemente por factores prostáticos presentes en la orina y también factores anatómicos) a menos que evolucione a una forma crónica.

Epidemiología

En la gran mayoría de los casos, la transmisión sigue la vía sexual y constituye la ITS no viral más frecuente en todo el planeta. La eficacia de transmisión es alta en ambos sentidos. Es posible la transmisión indirecta a través de fomites, baños, saunas, etc, pero su importancia estadística es despreciable. Es común que en un mismo paciente se encuentre asociada a otras ITS y/o a VB.

Está demostrado que la infección por *T.vaginalis*, aumenta significativamente la eficacia de la transmisión del HIV. Entre las hipótesis que se manejan para explicar este fenómeno, está la acumulación en el sitio de contacto, tanto de células infectadas por el virus como de células susceptibles a la infección por el mismo (Ej. linfocitos y macrófagos).

Tratamiento: Se realiza con metronidazol por vía oral. Los tratamientos locales no son efectivos. SIEMPRE debe indicarse tratamiento a la pareja, sea o no sintomática

Neisseria gonorrhoeae

La gonorrea es una infección aguda muy frecuente cuyo agente etiológico es *Neisseria gonorrhoeae*. Son cocos Gram negativos que se presentan en diplos con una morfología característica de granos de café enfrentados.

Tiene afinidad por el epitelio columnar (cérvix, uretra, glándulas parauretrales) y por las células de las criptas anales y faríngeas.

Manifestaciones clínicas

En el hombre heterosexual produce uretritis que se presenta con abundante exudado purulento y ardor miccional.

En la mujer suele observarse sólo una cervicitis (cuello rojo con tendencia a sangrar) con poca secreción, puede acompañarse de uretritis menos típica que en el hombre. Son muy comunes las formas asintomáticas. Las bartolinitis son muy inflamatorias y dolorosas pero son poco frecuentes.

Se observan también proctitis y faringitis dependiendo de la modalidad sexual.

Si no es tratada, la infección asciende a próstata y epidídimo en el hombre y al cuerpo del útero (endometritis) y/o trompas (salpingitis) en la mujer, pudiendo ocasionar

esterilidad.

Las complicaciones por diseminación sanguínea no son frecuentes: artritis, síndrome de Reiter, septicemia, endocarditis y meningitis.

También causa oftalmia purulenta, por autoinoculación en el adulto o por contagio en el canal de parto en el recién nacido (oftalmia neonatorum).

Tratamiento

No se recomienda la utilización de penicilina en las zonas donde los aislamientos productores de betalactamasa superan el 5% (caso de Argentina) Se recomienda el tratamiento en dosis única de ciprofloxacina, ceftriaxona o espectinomicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis microbiológico

Toma de muestras

1. Toma de muestras en infecciones cervicovaginales

Preparación previa:

La muestra debe tomarse con 48 h de abstinencia sexual. La paciente debe concurrir al laboratorio, previa higiene habitual, para reducir la contaminación con la microbiota colonizante. Los detergentes, antisépticos, desodorantes y ducha vaginal interna están totalmente contraindicados. Debe suspenderse, si es posible y previa consulta con el médico tratante, la administración de antimicrobianos por lo menos 48 h antes de la toma de muestra (algunos requieren más tiempo, Ej. azitromicina).

Recolección de la muestra:

En mujeres con actividad sexual: Solicitar a la paciente que se recueste en la camilla y que tome la posición ginecológica. Introducir cuidadosamente un espéculo estéril sin lubricantes (y de tamaño adecuado a la paciente) hasta visualizar el cuello de útero.

a. **Fondo de saco vaginal:** Tomar muestra con 3 hisopos.



-Primer hisopo: Con esta muestra se determina el pH vaginal y el test de aminas. Luego se descarta.

Determinación de pH: se realiza utilizando tiras reactivas comerciales que cubran un rango de pH entre 3 y 6. (Ej.: tiras "Acilit" de Merck) Tener en cuenta que pueden determinarse resultados falsos por duchas vaginales o contaminación con semen, moco cervical, sangre menstrual, etc.)

Test de aminas (Test de Whiff, prueba del KOH, Fishy odor test): Consiste en mezclar sobre un portaobjetos una gota de KOH 10% con secreción vaginal. La prueba es considerada positiva ante la presencia de olor a pescado y negativa en su ausencia.

-Segundo hisopo: se coloca en un tubo con 0,5 ml de Sol. Fisiológica estéril para exámenes microscópicos (en fresco y por coloraciones).

-Tercer hisopo: se coloca en un medio de transporte de Stuart.

b. Endocérvix: se realiza luego de la toma de fondo de saco vaginal. Realizar limpieza de exocérvix con una torunda de algodón sujeta con una pinza para disminuir la contaminación con flora vaginal. El tipo y cantidad de hisopos dependerá de los patógenos a estudiar. El primer hisopo se coloca en un tubo con 0.5 ml. de sol. fisiológica estéril para examen microscópico directo por coloraciones. Los hisopos siguientes se colocarán en medio de transporte adecuado.

En niñas premenárquicas y mujeres vírgenes: Tomar muestra del tercio exterior de vagina con un hisopo humedecido en solución fisiológica estéril. En niñas utilizar hisopos más delgados (tipo hisopo uretral) o con minipipetas de material sintético flexible, para evitar dentro de lo posible el dolor y las molestias ocasionadas por la extracción.

Conservación de la muestra:

Es conveniente procesar la muestra dentro de las 2 h de obtenida. No es aconsejable refrigerar las muestras, salvo excepciones puntuales que se detallarán luego.

2. Toma de muestra en secreción uretral

Todas las muestras deben tomarse con 72 h de abstinencia sexual y retención urinaria mínima de 3 h. La abstinencia sexual permite detectar la mayor concentración de microorganismos infectantes. Los detergentes, antisépticos y desodorantes están totalmente contraindicados.

En pacientes de sexo masculino que no presentan exudado, tomar el pene entre los dedos pulgar e índice (no olvidar el uso de guantes) y deslizar en dirección del meato ejerciendo una suave presión.

Recolectar la secreción presente en el meato con hisopo uretral embebido en solución fisiológica estéril. De no poder obtener exudado visible, introducir el hisopo por el orificio uretral unos 2 cm y rotar. Tener la precaución de no forzar el pasaje del hisopo a través de alguna obstrucción. De ser necesarios más de un examen o cultivo, tomar muestras separadas insertando cada hisopo 1 cm más profundamente que el anterior.

Si con los hisopos no se obtiene material en cantidad y calidad adecuadas, solicitar la obtención de un primer chorro.

- **Primer chorro miccional:** Realizar higiene de los genitales externos, con agua y jabón pervinox, tres veces, y enjuagar con agua abundante, efectuar previamente retracción del prepucio, ya que ésta es una zona colonizada por gérmenes, secar con gasa estéril o toalla descartable. Después de la higiene indicada, recoger los primeros 10 ml de orina en un recipiente estéril. Explicar correctamente al paciente la importancia de recoger los 10 ml primeros (haciéndole una marca en el frasco), de lo contrario se deberá repetir el muestreo. No refrigerar, enviar de inmediato al laboratorio.

3. Toma de muestras de úlceras genitales

Deberá usarse guantes y limpiar la superficie de la lesión con SF, y gasa, evitar el uso de jabones u otras sustancias que pudieran tener actividad antitreponémica; luego raspar suavemente la lesión con una gasa seca hasta que fluya el líquido seroso, pero sin provocar demasiada salida de sangre. Después continuar con el método adecuado para el germen que se quiera investigar (ver más adelante).

Procesamiento de las muestras

Muestras cervicovaginales

En fondo de saco se investiga: *Candida* spp., *Trichomonas vaginalis*, Vaginosis bacteriana, otros.

En endocérvix: *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma* spp., *C. trachomatis*.

Fondo de saco vaginal

A **Examen en fresco:** se coloca una alícuota de la muestra del segundo hisopo entre porta y cubreobjeto y se observa al microscopio con objetivos de 10x y 40x. Permite la búsqueda de leucocitos, levaduras, protozoarios flagelados compatibles con *T. vaginalis* y células guía (ver después).

B **Coloración de Gram:** realizar un frotis con el material del segundo hisopo y colorear con tinción de Gram. Permite la caracterización morfológica y tintoreal de las distintas especies presentes en la muestra. Permite además el cálculo del "Valor

Numérico de Nugent” (VN) según la siguiente tabla:

VN	0	1	2	3	4
Lactobacilos	>30	5-30	1-4	<1	0
Cocobacilos negativos (tipo <i>Gardnerella</i>)	0	<1	1-4	5-30	>30
Bacilos curvos (tipo <i>Mobiluncus</i>)	0	1-4	5- >30	--	--

Tomado de: Manual de procedimientos Balance del contenido vaginal (BACOVA).
Buenos Aires: Fundación Bioquímica Argentina, 2012.

Por ejemplo, a una muestra donde se observa un lactobacilo cada varios campos, abundantes cocobacilos negativos compatibles con *Gardnerella* y ningún bacilo curvo le corresponde un VN de 7.

Interpretación del VN:

0-3 normal, 4-6 disbacteriosis, 7-10 sugestivo de VB.

C **Cultivo:** Se realiza con el tercer hisopo (Ver medios de cultivo y utilidad de los mismos en la descripción de cada patógeno).

Endocérvix

A **Coloración de Gram:** El frotis se realiza con el primer hisopo. Permite determinar presencia de reacción leucocitaria y morfotipos bacterianos, principalmente *N. gonorrhoeae*.

B **Cultivo:** Se debe realizar con el resto de los hisopos según el patógeno buscado (Ver más adelante).

Muestras de secreción uretral

- Coloración de Gram: El frotis se realiza con el primer hisopo. Permite determinar presencia de reacción leucocitaria y morfotipos bacterianos, principalmente *N. gonorrhoeae*.

- Cultivo: Se debe realizar con el resto de los hisopos según el patógeno buscado (Ver más adelante).

Diagnóstico de Vaginosis Bacteriana (VB)

La muestra es el hisopado de fondo de saco vaginal.

- pH vaginal: generalmente es mayor a 4,5

- Test de aminas: generalmente es positivo debido a que por alcalinización con el KOH se volatilizan las aminas cadaverina, putrescina y trimetilamina provocando el característico “olor a pescado”.
- Examen en fresco: es característica la ausencia de reacción leucocitaria. De existir aumento significativo en la cantidad de leucocitos debe sospecharse de otra infección asociada. También pueden observarse las “clue cells o células guía” que son células epiteliales completamente cubiertas con cocobacilos hasta el punto de desdibujar los bordes celulares.
- Tinción de Gram: se utiliza para calcular el VN, el cual generalmente es mayor o igual a 7. También pueden observarse las clue cells.
- Cultivo: *Gardnerella* crece fácilmente en agar chocolate y agar sangre humana, pero dado que puede formar parte de la flora habitual, su desarrollo carece de significado diagnóstico.
- Métodos indirectos: análisis por cromatografía gaseosa del contenido vaginal detectando la relación succinato/lactato, detección de actividad sialidasa. No son de uso habitual en el ámbito clínico.

Los criterios diagnósticos de VB más aceptados actualmente son:

➤ Criterios clínicos: deben estar presentes por lo menos 3 de las siguientes cuatro características:

- Flujo vaginal abundante y homogéneo
- pH mayor a 4,5
- Test de aminas positivo
- Presencia de clue cells

Se informa que la muestra cumple los criterios clínicos de VB.

➤ Criterio microscópico: si el score de Nugent es mayor o igual a 7 se informa que la muestra cumple con el criterio microscópico de VB.

Estos criterios son independientes del cultivo. Si se obtiene desarrollo de *G. vaginalis* pero no se cumplen los criterios clínicos ni el microscópico, se informa como flora habitual.

Determinación del estado vaginal básico (EVB)

Lectura del Gram:

- Valor numérico de Nugent (VN): se establece de 1 a 10 de acuerdo al estudio de los morfotipos de la microbiota habitual de vagina.

- Presencia de células guía: se observa para realizar la corrección de VN, el hallazgo de dichas células, permite agregar 2 puntos al VN siempre y cuando éste, esté comprendido entre 0 a 6. Valores mayores a seis no necesitan corrección ya que son diagnósticos de vaginosis bacteriana.
- Análisis de la presencia de morfotipos extraños. Presencia de cocos y/o cocobacilos Gram positivos, bacilos Gram negativos compatibles con enterobacterias, bacilos Gram positivos corineformes y formas compatibles con *Actinomyces*.
- Determinación de reacción inflamatoria vaginal (RIV): se observa el número de leucocitos por campo con aumento de 1000X analizando no menos de cinco campos, no adyacentes. El valor de corte es una cifra igual o mayor de cinco leucocitos por campo.
- Investigación de levaduras con o sin presencia de pseudomicelios.

Coloración de Giemsa

- En caso de obtener en la coloración de Gram una cifra ≥ 5 leucocitos por campo, se realiza el recuento en el extendido teñido con Giemsa a 400X. El valor de corte en este caso es de uno o más leucocitos por célula epitelial y evidencia RIV significativa. Se investiga la presencia de *T. vaginalis* cuando éstas últimas no fueron encontradas en el fresco y la paciente presenta RIV significativa.

Con el VN y el RIV se puede definir el estado vaginal básico (EVB).

Estado Vaginal Básico (EVB)	Valor Numérico de la microbiota vaginal (VN)	Reacción Inflamatoria Vaginal (RIV)
I- Microbiota Normal (MN) Predominio de lactobacilos	0 a 3	NO
II- Microbiota Normal + RIV Predominio de lactobacilos con reacción inflamatoria vaginal	0 a 3	SI
III -Microbiota Intermedia (MN + RIV) Equilibrio de lactobacilos y bacterias Anaeróbicas	4 a 6	NO
IV- Vaginosis Bacteriana (VB) Predominio de bacterias anaeróbicas	7 a 10	NO
V- Vaginitis Microbiana Inespecifica (VMI) Alteración de la relación de lactobacilos y anaeróbicos con reacción inflamatoria	4 a 10	SI

Tomado de: Manual de procedimientos Balance del contenido vaginal (BACOVA). Buenos Aires: Fundación Bioquímica Argentina, 2012.

Diagnóstico de Vulvovaginitis por Levaduras (VVL)

Las muestras adecuadas son: hisopado de fondo de saco, hisopado del surco balano-prepucial.

- pH vaginal: generalmente es inferior a 4,5.
- Test de aminas (en flujo vaginal): negativo.
- Examen en fresco: suele aportar los datos más valiosos para el diagnóstico en más de la mitad de los casos. La respuesta inflamatoria es variable. Se observan elementos levaduriformes refringentes acompañados o no por pseudomicelio. Se informa como N^o/cpo de 400x.
- Tinción de Gram: se observan elementos levaduriformes gram positivos acompañados o no por pseudomicelio.
- Cultivo: la positividad del cultivo con examen microscópico directo negativo es significativa sólo en pacientes sintomáticas donde se descartó otra patología asociada. Aislar y tipificar la levadura es de gran importancia, pues conocer la especie permite predecir en líneas generales la respuesta a distintos esquemas terapéuticos. Por ejemplo *C. krusei* es resistente frente a algunos de los antifúngicos azólicos utilizados, mientras que es muy rara la aparición de resistencia en *C. albicans*. Si no se puede definir la especie en cuestión debe informarse como levadura no *Candida albicans*, ya que si bien son casos aislados, existen infecciones por géneros distintos a *Candida*. Existen varios medios de cultivo disponibles. Los más utilizados son Agar Sabouraud y CHROMagar Candida. Este último es un medio comercial que permite una identificación presuntiva de las especies más prevalentes basándose en diferencias de color de las distintas colonias. Esta característica también le permite la detección de infecciones mixtas (por más de una especie de levadura).
- Estudio de sensibilidad a antifúngicos: Sólo se justifica en caso de aparición de cepas con sensibilidad poco conocida o en caso de la falta de respuesta al tratamiento usado.

Diagnóstico de Vulvovaginitis por *Trichomonas* (VVT)

Las muestra adecuadas son hisopado de fondo de saco, hisopado uretral y sedimento del primer chorro.

- pH vaginal: generalmente está aumentado, pero a diferencia de la VB la infección puede cursar con pH normal.

- Test de aminas (en flujo vaginal): en la mayoría de los casos es positivo, aunque raramente puede ser negativo.
- Examen en fresco: es el método diagnóstico más importante en la práctica diaria por su sencillez y bajo costo. El parásito se identifica por su movilidad característica. La sensibilidad de este método es del 40-80% en flujo vaginal dependiendo del operador, calidad de la muestra, etc. En muestras uretrales la sensibilidad es extremadamente baja.
- Tinción de Gram: su sensibilidad es menor al 10%.
- Tinción de Giemsa: su realización aumenta los costos y su sensibilidad no alcanza la del examen en fresco.
- Cultivo: es el método “gold standard” y uno de los más sensibles al alcance del laboratorio clínico. Tiene la desventaja de aumentar los costos pudiendo llegar a ser no costo-efectivo. Una estrategia alternativa puede ser dilatar el cultivo hasta después del examen en fresco (si éste no demora demasiado) y cultivar sólo aquellas muestras con fresco negativo. En las muestras uretrales el cultivo es mandatorio. Los medios comerciales más usados son el de Diamond, Feimberg-Whittington y Kupferberg.

Diagnóstico de *Neisseria gonorrhoeae*

Las muestras adecuadas son: hisopado uretral (femenino o masculino), hisopado endocervical, hisopado conjuntival, hisopado faríngeo, hisopado rectal e hisopado vaginal en niñas prepúberes cuando se sospecha de abuso sexual.

Toda muestra debe ser tomada antes de comenzar la antibiòticoterapia, pues el gonococo es fácilmente inhibido por ellos en su desarrollo, aunque continúe la infección.

Si la muestra no se siembra inmediatamente en la misma sala de extracción, debe ser transferida a un medio de transporte adecuado como el de Stuart o de Amies. De todos modos no es conveniente demorar la siembra más de un par de horas. El algodón de los hisopos más comúnmente usados en un laboratorio clínico suelen ser tóxicos para el germen. Deben preferirse los hisopos de dacrón o alginato. De no poder contar con éstos, puede acondicionarse los hisopos comunes para disminuir su toxicidad de la siguiente manera:

1. Hervir los hisopos de algodón en una solución buffer de Sorensen pH 7.4 durante 5 minutos. Un vaso de precipitado de 150 ml con 80 ml del buffer alcanza para hervir aproximadamente 100 hisopos.
2. Escurrir los hisopos y sumergirlos en una solución de carbón activado al 1% en agua destilada. Rotarlos de manera que los hisopos queden penetrados por la suspensión y ennegrecidos.

3. Escurrir los hisopos y secarlos con calor seco (35-37°C).
4. Fraccionar y esterilizar a 170°C durante 1 h. No autoclavar. Almacenar a temperatura ambiente.

- Tinción de Gram: se observan abundantes leucocitos polimorfonucleares y diplococos Gram negativos, intracelulares en el período agudo. Al pasar los días de enfermedad se observarán formas intra y extracelulares, predominando las últimas en los episodios tardíos. En hombres, la evidencia de diplococos Gram negativos intracelulares en el examen directo de una muestra de origen genital, es diagnóstico de la enfermedad, con una sensibilidad del 95-98%. Por otra parte, los frotis coloreados con Gram, de muestras endocervicales o anorrectales, pueden contener microorganismos morfológicamente semejantes, lo cual vuelve necesario la confirmación por cultivo del hallazgo microscópico. Además la sensibilidad del examen directo en estas últimas muestras es demasiado baja.

- Cultivo: Es un germen fastidioso que necesita para su desarrollo medios ricos y selectivos.

- Medio selectivo de Thayer Martin (TM), adicionado de vancomicina, colistina y nistatina, que inhiben casi toda la flora contaminante de la muestra sin afectar a *N. gonorrhoeae*.

- Es difícil su aislamiento en agar chocolate sin inhibidores, pues en muestras con mucha flora agregada ésta puede enmascararlo. Sin embargo, es de buena práctica añadir una placa de agar chocolate para recuperar aquellas cepas (poco frecuentes) que son inhibidas por la vancomicina del TM.

- No puede crecer en agar sangre.

- La incubación se hará a 35°C (no debe llegar a 37°C) en atmósfera húmeda con 2-5% de CO₂ (lata hermética con vela encendida y algodón humedecido). Debe prolongarse hasta 72 h para poder descartar un cultivo como negativo.

- Identificación presuntiva: cuando existe una fuerte sospecha clínica, el siguiente grupo de pruebas alcanza para identificar presuntivamente una cepa de *N. gonorrhoeae*:

- Colonias típicas que desarrollan en TM (blanco grisáceas, de bordes regulares, convexas, translúcidas, de 0,1 a 1 mm de diámetro y ligeramente viscosas, pueden haber variantes muy pequeñas de 0,1 a 0,2 mm de diámetro)

- Tinción de Gram de la colonia: diplococos negativos

- Reacción de oxidasa positiva

- Prueba de superoxol positiva. Esta prueba es semejante a la prueba de la catalasa pero realizada con H₂O₂ 30% (100 vol.) Un resultado positivo se caracteriza por un

burbujeo muy intenso y brusco que forma una espuma densa y consistente (el fenómeno recuerda al hongo formado por la explosión de una bomba atómica).

- Cuando se cumplen todas estas condiciones se informa: “desarrollo compatible con *Neisseria gonorrhoeae*, productor de betalactamasa (o no productor de betalactamasa)”⁰ (ver más adelante).

- Identificación confirmatoria: se realiza después de haber completado la identificación presuntiva, en los casos en los que ésta no es suficiente. (Ej.: investigación de abuso sexual u otras situaciones con implicancias médico-legales donde la certeza diagnóstica es crucial, casos de falla terapéutica para corroborar diagnóstico, etc...) Las especies de *Neisseria* se diferencian entre sí basándose en la prueba de ONPG y sus patrones de producción de ácido a partir de distintos azúcares. Los medios base para las pruebas pueden ser Agar Cistina Tripteína o Medio base con azul de bromotimol. Los azúcares se incuban a 35°C sin CO₂ hasta 5 días antes de descartar como negativos. Una reacción positiva se manifiesta por cambio de color. Cuando se utiliza rojo fenol como indicador el viraje es del naranja rojizo al amarillo. Si se utiliza azul de bromotimol, el viraje es de verde a amarillo.

	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	ONPG
<i>N.gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-
<i>N.meningitidis</i>	+	+	-	-	-
<i>N.lactamica</i>	+	+	+	-	+
<i>N.cinerea</i>	-	-	-	-	-
<i>N.polysaccharea</i>	+	+	-	-	-
<i>N.subflava</i>	+	+	-	V	-
<i>N.sicca</i>	+	+	-	+	-
<i>N.mucosa</i>	+	+	-	+	-
<i>N.flavescens</i>	-	-	-	-	-
<i>N.elongata</i>	-	-	-	-	-

- Sensibilidad: el método recomendado es la determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM) y es realizado únicamente por laboratorios de referencia. Sin embargo se aconseja a los laboratorios en general la realización del antibiograma (método de difusión por discos) a modo de “screening”. Se realiza en agar GC suplementado. Se aconseja realizar como mínimo la detección cualitativa de betalactamasa, preferentemente por el método del nitrocefín.

Medios y reactivos**Medio de transporte de Stuart**

Ver práctico de Enterobacteriaceae.

Medio de Sabouraud

Fórmula (en gramos por litro)

Pluripeptona	10,0
Glucosa	40,0
Cloramfenicol	0,05
Agar	15,0

pH final: 5,6 ± 0,2

Suspender los componentes en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Distribuir en placas de Petri. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes.

Medio para *Trichomonas vaginalis*

Preparar caldo cerebro corazón y adicionar L-cisteína en cantidad suficiente para alcanzar una concentración de 0.05%. Llevar a pH 7.0 Esterilizar 30 minutos en vapor fluente. Dejar entibiar

Agregar penicilina G (1000 U/ml), gentamicina (500µg/ml) y suero (10%). Fraccionar en tubos.

Medio Thayer Martin

Fundir un tubo de medio base, enfriar a 50°C y mezclar con un tubo de hemoglobina entibiado a 50°C. Colocar en placa estéril 0,1 ml de la solución antibiótica y 0,1 ml de suplemento vitamínico Isovitalex o similar.

Medio base

Proteosa peptona	15 g
Almidón	1 g
Fosfato dipotásico	4 g
Fosfato monopotásico	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	10 g
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

Con esta fórmula resulta un medio de concentración doble que se fracciona en tubos por 5 ml y se esteriliza durante 15' a 121°C.

Hemoglobina disecada

Se diluyen 5 g en 250 ml de agua destilada. Se fracciona en tubos por 5 ml y se esteriliza durante 15' a 121°C y se guarda en la heladera.

Mezcla antibiótica

Contiene: Vancomicina, Colistina, Nistatina. Se obtiene en el comercio ya preparada y se diluye según indicación.

Buffer Fosfato de Sorensen

Solución A: disolver 0.946g de Na₂HPO₄ anhidro en 100ml de H₂O(d)

Solución B: disolver 0.907g de K₂HPO₄ anhidro en 100ml de H₂O(d)

pH	Volumen (ml)	
	Solución A	Solución B
5,29	0,25	9,75
5,59	0,5	9,5
5,91	1	9
6,24	2	8
6,47	3	7
6,64	4	6
6,81	5	5
6,98	6	4
7,17	7	3
7,38	8	2
7,73	9	1
8,04	9,5	0,5

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

-Observar instrumentos ginecológicos utilizados en la toma de muestra: espéculos, hisopos uretrales, hisopos de alginato.

-Observar al microscopio óptico los siguientes extendidos obtenidos de muestras genitales:

1) *Lactobacillus* spp, células vaginales, levaduras (**exudado normal**).

2) *Gardnerella vaginalis*. Celulas guía. Complejo Gamm. (**exudado potencialmente**

patológico).

3) *Neisseria gonorrhoeae*. Leucocitos polimorfonucleares con diplococos Gram negativos intra y extracelulares (**exudado patológico**).

4) *Trichomonas vaginalis*. Tinción de Giemsa (**exudado patológico**).

5) *Candida* spp. Levaduras en activa multiplicación: hifas, pseudomicelios (**exudado patológico**).

BIBLIOGRAFÍA

-Enfermedades de transmisión sexual. Microbiología Clínica. Prats G. Ed. Médica Panamericana. España. 2006.

- Basso B, Belchior S, Castillo M, De Mier C. y col. Manual de Procedimientos: BACOVA 2012. p 1-27. PROSAR. prosar@fba.org.ar.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°6 HEMOCULTIVO

OBJETIVOS

- Adquirir conocimiento acerca de la importancia del hemocultivo y de una adecuada toma de muestra.
- Conocer las principales bacterias causantes de septicemia y métodos de procesamiento de un hemocultivo.
- Alcanzar el conocimiento para poder interpretar con exactitud los resultados obtenidos.

INTRODUCCION TEÓRICA

El hemocultivo o cultivo microbiológico de la sangre es uno de los métodos de mayor importancia en bacteriología clínica por su implicancia diagnóstica. Frente a un cuadro de sepsis se debe recurrir al hemocultivo porque es el único modo de precisar su etiología y establecer un diagnóstico acertado.

INDICACIONES PARA LOS HEMOCULTIVOS

La indicación clásica de obtener hemocultivos, es la sospecha de bacteriemia en pacientes con o sin foco aparente de infección. Los factores clásicos asociados a la presencia de bacteriemia verdadera son:

- 1) La presencia de escalofríos y fiebre mayor a 38,3°C.
- 2) Existencia de enfermedades subyacentes severas (usualmente mortales a un plazo no mayor de 5 años).
- 3) Cuadros de abdomen agudo y el antecedente de drogadicción intravenosa.
- 4) Todas aquellas infecciones que producen bacteriemias verdaderas continuas, como la endocarditis infecciosa y en general, las infecciones endovasculares. En los casos en que no existe alguno de estos marcadores de bacteriemia o cuando el paciente ya está recibiendo antimicrobianos, la probabilidad de aislar agentes infecciosos en hemocultivos disminuye en forma muy significativa.

Para poder interpretar las técnicas de hemocultivo, es necesario aclarar algunos conceptos:

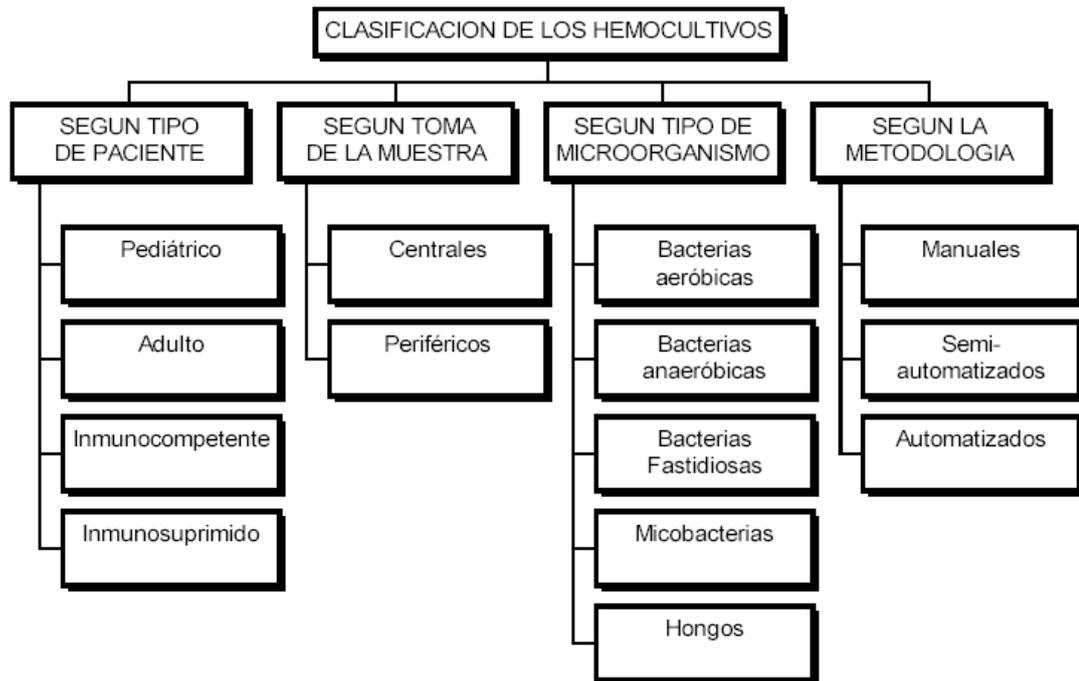
Septicemia (bacteriemia verdadera): es un síndrome ocasionado por la presencia de bacterias en sangre, que provienen de un foco séptico, en proceso activo de multiplicación, hallándose sus toxinas en circulación. En esta circunstancia el hemocultivo es persistentemente positivo y existen síntomas clínicos de infección sistémica como: escalofríos, fiebre, sudoración, postración, etc.

Bacteriemia: es el pasaje transitorio de bacterias a la sangre, pudiendo ocurrir luego de extracciones dentales, amigdalinas, incluso por un cepillado de dientes. Estas bacterias que ingresan a la sangre son eliminadas por el sistema retículo endotelial (SRE). En este caso el hemocultivo puede llegar a ser positivo pero no confirmado en la repetición del examen, además se diferencia de una septicemia porque no hay síntomas clínicos.

CLASIFICACIÓN DE LOS HEMOCULTIVOS

Los hemocultivos se pueden clasificar:

- 1) según el tipo de paciente, pues los microorganismos son distintos según si se trata de un paciente inmunosuprimido o inmunocompetente, también si se trata de pacientes adultos o pediátricos o si se trata de enfermos que estén o no bajo terapia antimicrobiana.
- 2) Según la toma de la muestra pueden ser hemocultivos periféricos o centrales (obtenidos a través de un catéter venoso central).
- 3) Según el tipo de microorganismos que se esté investigando, ya que se requieren distintos sistemas de hemocultivos según si se sospechan bacterias aeróbicas, anaeróbicas, fastidiosos, micobacterias u hongos.
- 4) Según la metodología de los sistemas de hemocultivos en métodos convencionales (manuales), en sistemas semiautomatizados como el sistema Lisis-centrifugación o en sistemas automatizados como BACTEC.



Esquema extraído de "Bacteriología General, Dra. García Patricia C.y Perez Carlos C. Pontificia Universidad Católica de Chile. 2008.

BACTERIAS CAUSANTES DE SEPTICEMIA AGRUPADAS SEGÚN LA FRECUENCIA DE SU HALLAZGO

Cocos Gram positivos:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus viridans*
- *Streptococcus* beta hemolítico
- *Streptococcus pneumoniae*
- Enterococos

Bacilos Gram negativos:

- *Brucella* sp.
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Enterobacterias (*E. coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp., otras)
- *Acinetobacter*
- *Haemophilus*

Otras Bacterias:

- *Listeria monocytogenes*
- *Bacteroides* sp.
- *Fusobacterium*
- *Peptococcus*
- *Neisseria meningitidis*

MATERIALES Y MÉTODOS**Extracción de la muestra**

Dado que la endocarditis infecciosa, especialmente en válvulas cardíacas protésicas puede ser causada por microorganismos indígenas de la piel (*S. epidermidis*, *Corynebacterium*, etc.) debe reducirse al mínimo la contaminación de los hemocultivos durante el proceso de extracción de sangre. Esto se evita con una cuidadosa preparación de la piel empleando un agente bactericida como tintura de yodo.

La sangre para cultivo no debe extraerse a través de un catéter permanente intravenoso o intraarterial a menos que no pueda obtenerse por punción venosa. Lo ideal es extraer de venas próximas al foco séptico, pero generalmente se extraen de venas de la flexura del codo.

Después de la palpación, el sitio de punción debe limpiarse con alcohol etílico al 70% y luego frotarse en forma concéntrica con tintura de yodo al 1 o 2% o solución de povidona-yodo al 10%. Debe dejarse secar el desinfectante antes de la extracción. Si fuera necesaria una ulterior palpación de la vena durante la extracción debe desinfectarse el dedo o emplear guante estéril.

Las tapas de los frascos de cultivo o tubos de recolección deben desinfectarse con alcohol o solución de yodo y dejarlas secar.

Se usan jeringas con aguja 25/8 o 30/8 descartables.

En lo posible se debe sembrar directamente en el frasco con el medio de cultivo es decir, a la cabecera del enfermo.

Volumen de sangre y dilución:

Para detectar una bacteriemia o fungemia debe existir al menos un microorganismo viable presente en la muestra de sangre a cultivar. El volumen de sangre cultivada debe variar según se trate de niños o adultos; dado que no es aconsejable tomar grandes volúmenes a niños pequeños, especialmente neonatos.

- En lactantes y niños resulta suficiente un volumen de 1 a 5 ml por cultivo, dado que las concentraciones de microorganismos son suficientemente elevadas como para detectar bacteriemia con poco volumen de sangre.
- En adultos se aconseja sembrar no menos de 10 ml ni más de 20 ml. Esta cantidad es necesaria para aumentar las posibilidades de hallazgo del microorganismo en sangre cuyo número puede variar de una bacteria a varios centenares/ml. Volúmenes superiores a 30 ml no son aconsejados dado que contribuyen a producir anemia.
- La relación recomendada sangre-caldo de cultivo es de 1:5 a 1:10; dilución de 1:20 o más no son necesarias si se usa medio con PSS que inhibe el efecto bactericida del suero humano. En el caso de lactantes y niños pueden ser necesarias diluciones mayores.

Número de muestras y momento de la extracción:

La cantidad y frecuencia de las muestras a extraer debe ser dispuesta por el médico sobre la base del cuadro clínico presentado por el paciente. Nunca una sola muestra puede servir para descartar una bacteriemia. Se considera que 2 muestras son suficientes en la mayoría de los casos.

Ante la presencia de fiebre intermitente, la sangre para cultivo debiera obtenerse idealmente durante la hora previa al proceso febril esperado, ya que es aproximadamente ese, el tiempo que transcurre entre el paso de bacterias al torrente sanguíneo y el comienzo de la fiebre y la sangre puede estar estéril en el momento en que la fiebre comienza.

- En caso de sospecha de sepsis aguda, meningitis, osteomielitis, artritis o neumonía bacteriana aguda no tratada, obténganse dos hemocultivos por punción de dos venas diferentes, antes del comienzo de la terapia.
- En caso de fiebre de origen desconocido (abscesos ocultos, fiebre tifoidea o brucelosis) obténganse inicialmente dos hemocultivos separados y otros dos a las 24 o 36 h, antes que se produzca el aumento de temperatura esperado.
- En caso de endocarditis infecciosa subaguda obtener dos muestras de sangre el primer día cada 15', si son negativas otras dos muestras a las 24 h.

Salvo en las situaciones clínicamente urgentes como en las mencionadas anteriormente, en las que se hace necesario reducir los intervalos a minutos de modo de obtener sangre antes de iniciar la terapia antimicrobiana, los hemocultivos pueden efectuarse con intervalos de aproximadamente una hora.

La terapia antimicrobiana previa puede traer como consecuencia resultados negativos de los hemocultivos, pero lo que ocurre más frecuentemente es un crecimiento retardado de

los microorganismos; por lo tanto, los hemocultivos de pacientes parcialmente tratados, deben incubarse como mínimo 14 días.

Medios de cultivo:

Para su elección, es importante conocer: diagnóstico presuntivo, días y evolución de la enfermedad, sexo, edad, terapia, etc. Se recomienda muchos medios líquidos nutricionalmente enriquecidos "Multipropósitos (ej. tripteína, o soja tripticase, infusión cerebro corazón) destinados a la recuperación de bacterias aerobias y anaerobias facultativas. El potencial redox (aproximadamente - 175 mV) de varios tipos de frascos al vacío preparados comercialmente para el aislamiento de bacterias aeróbicas, es lo suficientemente bajo, como para permitir el crecimiento de las anaeróbicas sin necesidad de usar caldo para hemocultivo anaeróbico como el tioglicolato.

Lo ideal sería sembrar dos frascos: uno en anaerobiosis y otro en aerobiosis especialmente cuando se sospecha de aerobio estricto ya que estos pueden desarrollar en concentraciones no macroscópicas a ese potencial redox, aunque son evidenciables por medio de los subcultivos de rutina.

Aditivos:

- Anticoagulantes: La mayoría de los medios preparados comercialmente están adicionados con 0,025%-0,05% de polianetol sulfonato de sodio (PSS), un anticoagulante polianiónico que inhibe la actividad del complemento y la lisozima, interfiere con la fagocitosis e inactiva las concentraciones de aminoglucósidos clínicamente alcanzables. Como desventajas de su uso podemos señalar que inhibe el desarrollo de algunas cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Gardnerella vaginalis* y de *Peptoestreptococcus anaerobius*. El efecto inhibitorio del PSS puede neutralizarse adicionando al medio 1,2% de gelatina.

La Heparina, para algunos autores, es de segunda elección, puede ser tóxica para algunas bacterias y no resiste la esterilización por calor. Citrato, oxalato y EDTA no son adecuados porque inhiben el desarrollo de algunos gérmenes. El amilosulfato de sodio no se recomienda ya que disminuye el desarrollo de *S. aureus* en el caldo de tripteína soja.

Inmediatamente después de la recolección debe mezclarse bien los contenidos de los frascos (sangre-anticoagulante) para evitar la coagulación.

- Sacarosa al 10-20%. La desventaja del agregado de sacarosa es la hemólisis espontánea que obstaculiza el examen microscópico en los frascos de hemocultivo.
- Cisteína: suele agregarse a los medios de cultivo como reductora.

- Menadiona y Hemina: para cuando se sospecha de microorganismos exigentes como *Bacteroides melaninogenicus*.
- Enzimas: cuando el paciente recibió o está recibiendo antibióticos, además de hacer una mayor dilución de la sangre en el medio de cultivo (1/20), se puede adicionar enzimas que la inactiven, como por ejemplo penicilinas cuando la concentración de antibióticos Betalactámicos en sangre es elevado.
- Resinas: tienen la propiedad de absorber los antimicrobianos, con el inconveniente de hemolizar la sangre y aumentar el riesgo de contaminación.

Procedimiento

Procedimientos generales

- a) Los hemocultivos corrientes se incuban por 7 días a 35 °C en atmósfera normal y en endocarditis bacteriana subaguda hasta 14 días.
- b) Observar diariamente el aspecto macroscópico en busca de signos que indiquen desarrollo bacteriano: hemólisis, turbidez, presencia de gas, colonias, etc. En ese momento hacer tinción de Gram directo de la siguiente forma: homogeneizar el contenido del frasco de hemocultivo por agitación suave, colocar una gota en el extremo del portaobjeto y extender con un cubreobjeto en ángulo de 45°. Subcultivar a placas de agar chocolate suplementado y a placa de agar sangre de carnero al 5%. Incubar a 35-37°C en forma aeróbica y anaeróbica.
- c) Realizar coloración de naranja de acridina y subcultivos ciegos aunque no se observen evidencias de desarrollo a las 24 hs y al 7º día de incubación, independientemente del aspecto macroscópico que presente la botella, realizar otro repique a ciegas.
- d) Observar características macroscópicas de las colonias y hacer tinción de Gram directo.
- e) Efectuar las pruebas bioquímicas y estudio de susceptibilidad antimicrobiana que corresponda al tipo de aislamiento.

Interpretación de resultados:

DIFERENCIACIÓN ENTRE BACTERIEMIA VERDADERA VERSUS CONTAMINACION

No todos los hemocultivos positivos son clínicamente significativos. Se acepta un porcentaje de contaminación que varía entre un 2 a 3% y representa costos muy altos para las instituciones y los pacientes. Esta contaminación se atribuye principalmente a una contaminación durante la toma de muestra, ya que con los sistemas de hemocultivos automatizados, la posibilidad que se contaminen en el laboratorio es remota. Se han

propuesto algunas recomendaciones que permiten predecir una bacteriemia verdadera, sin embargo la decisión final de la significancia clínica de un hemocultivo positivo, depende en última instancia de la presentación clínica y del curso de la enfermedad en un paciente determinado.

Tipo de microorganismo

Cuando el microorganismo aislado corresponde a flora de la piel, es necesario diferenciar si se trata de una bacteriemia verdadera o de una contaminación.

Clásicamente se ha establecido que un 94% de *Staphylococcus* coagulasa negativo aislados de un solo hemocultivo, corresponden a contaminaciones. Lo mismo ocurre con el 94% de *Bacillus* spp., 99% de *Propionibacterium acnes*, 79% de *Corynebacterium* spp., 50% de *Clostridium perfringens* y 48% de *Streptococcus viridans*. Sin embargo, estos pueden ser considerados patógenos cuando se aíslan en hemocultivos múltiples, cuando corresponden a pacientes inmunosuprimidos o a pacientes portadores de dispositivos protésicos como catéteres venosos centrales, prótesis ortopédicas, prótesis vasculares o válvulas de derivación ventrículo-peritoneal.

En la actualidad *Staphylococcus* coagulasa negativo es la principal causa de bacteriemia intrahospitalaria y la mayoría de las veces se relaciona al uso de catéteres venosos centrales.

Hemocultivos positivos múltiples al mismo microorganismo

Se considera como septicemia cuando se aísla el mismo microorganismo en varios hemocultivos, aunque sean microorganismos de la piel.

Procedimientos especiales y complementarios:

Brucelosis: Los sistemas automatizados y semiautomatizados permiten una buena recuperación. Si se usan cultivos en caldos multipropósitos, se hacen subcultivos después de 4 días de incubación y luego semanalmente en placas de agar brucella o TSA adicionado de suero que se conservan de 2 a 4 semanas a 35°C y 10% CO₂.

Leptospirosis: Se recomienda medios adicionales de sueros de conejo o ácidos grasos y albúmina. El suero se adiciona 14% (v/v).

Se agregan a los tubos con 5 ml del medio, 1 a 3 gotas de sangre o con PSS y se incuban en oscuridad a 28-29°C 4 a 6 semanas. Se examinan semanalmente los cultivos al microscopio de campo oscuro. La leptospiremia se produce sólo en fase aguda, que dura 4 a 7 días.

Variantes nutricionales de estreptococos: algunas cepas de *Streptococcus viridans*, son dependientes de piridoxal para su desarrollo; en la sangre humana parece haber

suficientes piridoxal (Vit B6) u otros nutrientes esenciales para permitir su recuperación de hemocultivos, pero es incapaz de crecer en subcultivos a menos que se adicionen a los medios clorhidrato de piridoxal (0,001%), L-cisteína (0,05, 1%) o ambos.

Micosis sistémica

El método de elección es el de lisis-centrifugación que recupera levaduras y hongos dimórficos. Si se usan frascos comerciales multipropósitos se deben ventilar. Se incuban a 22-30°C durante un mes.

Microorganismos con deficiencia de pared celular

Se sospecha frente a un paciente con endocarditis bacteriana que presenta hemocultivos negativos. Es muy raro aislar bacterias con este tipo de deficiencia, se aconseja incorporar sacarosa o manitol al 10%.

Micobacterias

El método de lisis-centrifugación ha sido el método más ampliamente utilizado, ya que las micobacterias son microorganismos intracelulares y la lisis celular permite la liberación de las micobacterias lo que favorece su desarrollo. Se puede usar métodos automatizados como BACTEC™ 13 A radiométrico.

HACEK

El término HACEK es un acrónimo para un grupo de bacilos Gram negativos fastidiosos que incluyen a *Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* y *Kingella kingae*.

Estas bacterias se recuperan en hemocultivos de pacientes con endocarditis infecciosa, aunque pueden aislarse a partir de otros focos infecciosos. Las recomendaciones para los hemocultivos en que exista la sospecha clínica de infección por HACEK son: mantener la incubación inicial por 7 a 14 días y efectuar subcultivo terminal a los 7 y 14 días.

SISTEMAS AUTOMATIZADOS Y SEMIAUTOMATIZADOS

SISTEMAS SEMIAUTOMATIZADOS: LISIS-CENTRIFUGACIÓN

Consiste en un tubo de lisis cuyo contenido es el polianetol sulfonato de sodio como anticoagulante, saponina como agente lítico de eritrocitos, leucocitos y macrófagos, polipropilenglicol como antiespumante y un fluoroquímico inerte de alta densidad. Luego se somete a la muestra a una centrifugación a alta velocidad que permite la concentración de microorganismos en el sedimento que se siembra en medios de cultivo específicos.

SISTEMAS AUTOMATIZADOS

Los sistemas automatizados consisten básicamente en botellas con diversos medios de cultivo (aeróbicos, anaeróbicos, hongos, micobacterias y con resinas que captan antibióticos) que se incuban en equipos que agitan constantemente las muestras y que poseen modernos sistemas de detección microbiana. Estos se basan en la detección de productos del metabolismo bacteriano (CO_2) mediante técnicas radiométricas, espectrofotométricas, fluorométricas y/o colorimétricas. La computadora asociada a los equipos relaciona las mediciones con índices o gráficas de crecimiento microbiano que dan un aviso cuando la detección sobrepasa un punto de corte. Las botellas se descargan, se hace una tinción de Gram y se informan precozmente.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Extraer dos muestras de sangre por punción venosa de la flexura del codo e inocular en frascos de hemocultivo con caldo multipróposito. Las muestras serán contaminadas por el personal docente con una bacteria potencialmente productora de septicemia e incubadas 24-48 h a 37°C. (Actividad realizada previa al día del Trabajo Práctico).
- Observar macroscópicamente los frascos de hemocultivo para la detección visual de desarrollo bacteriano (turbidez, hemólisis, película, presencia de gas).
- Realizar un extendido y coloración de Gram a partir de los hemocultivos positivos. Observar al microscopio para detectar la morfología bacteriana que orienta al diagnóstico temprano.
- Aislar e identificar el microorganismo involucrado en la sepsis.
- Integrar la marcha bacteriana realizada.

BIBLIOGRAFÍA

- Septicemia: bacteriemia y fungemia. Microbiología Clínica. Prats G. Ed. Médica Panamericana. España 2006.
- Infecciones por estafilococos. Dominguez-Luzon M, Rodriguez Bano J. Tratado SEIMIC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana. 2006. España.
- Staphylococcus* y microorganismos relacionados. Microbiología Clínica. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Elsevier. 2006. España.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°7

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO (LCR)

OBJETIVOS

- Conocer los principales agentes etiológicos de meningitis bacteriana y adquirir destreza en el estudio y procesamiento del líquido cefalorraquídeo.
- Aplicar criterios adecuados, en la interpretación de los resultados obtenidos y en la generación del informe correspondiente.

INTRODUCCION TEÓRICA

El líquido cefalorraquídeo (LCR) rodea completamente al encéfalo y médula espinal y cumple diferentes funciones, amortigua la masa cerebral y le proporciona flotabilidad reduciendo el peso efectivo del encéfalo. Mediante su circulación alrededor del encéfalo, ventrículos y médula espinal, transporta metabolitos esenciales para las neuronas y elimina los productos de desecho. Es producido en los plexos coroideos por células secretoras especializadas ubicadas en la parte central del cerebro, tercer y cuarto ventrículo. El LCR fluye alrededor del cerebro dentro del espacio subaracnoideo por la presión producida en el plexo coroideo. El espacio subaracnoideo se encuentra entre la piamadre (membrana que cubre directamente el encéfalo), y la aracnoides (membrana delicada que cubre el encéfalo y parte de la médula espinal). Estas dos membranas se denominan en forma conjunta Leptomeninges. El conjunto de membranas que rodean al cerebro incluyendo la duramadre se denomina Meninges.

La infección localizada en el espacio subaracnoideo o en las leptomeninges se denomina Meningitis.

El SNC puede ser invadido por la casi totalidad de los microorganismos patógenos conocidos: bacterias, virus, hongos y parásitos. En pacientes sometidos a tratamiento con antibióticos, esteroides, inmunosupresores o que padecen SIDA o enfermedades crónicas debilitantes (cáncer, leucemia, diabetes, colagenosis, etc.) pueden presentarse infecciones del SNC por patógenos oportunistas diferentes a los que producen procesos infecciosos neurológicos en la población general.

La mayoría de estos agentes infecciosos llegan a la leptomeninges por diseminación

hematógena, penetrando en el espacio subaracnoideo a través de los plexos coroideos o de otros vasos sanguíneos del cerebro.

Principales agentes de Meningitis Bacteriana

Streptococcus pneumoniae

Neisseria meningitidis

Haemophilus influenzae tipo b

Mycobacterium tuberculosis

Treponema pallidum

En neonatos los principales agentes etiológicos son:

Streptococcus beta hemolíticos grupo B (*S. agalactiae*)

Escherichia coli

Listeria monocytogenes

Enterococos

Treponema pallidum

Herpes virus

Enterovirus

En pacientes con inmunodepresión o en enfermedades debilitantes los principales son:

Listeria monocytogenes

Streptococcus agalactiae

Enterococcus spp.

Staphylococcus aureus

Bacilos gram negativos

Mycobacterium spp.

Treponema pallidum

Principales bacterias implicadas en meningitis nosocomiales:

Bacilos gram negativos (*Enterobacter*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*)

Staphylococcus aureus

Staphylococcus coagulasa negativa

Streptococcus del grupo viridans

Enterococos

Clostridium perfringens

El estudio del Líquido Cefalorraquídeo (LCR) en pacientes sospechosos de tener un proceso infeccioso del Sistema Nervioso Central (SNC), representa uno de los más

importantes **procedimientos de urgencia** que debe realizar el laboratorio de microbiología clínica. Esto se debe a la imperiosa necesidad de instalar una terapia antimicrobiana eficaz cuando se identifica el agente infeccioso involucrado, para salvar al paciente de la muerte o de secuelas importantes y permanentes.

En vez de:

Ante cualquier paciente con una infección neurológica es preciso realizar el **Diagnóstico precoz** y el **Tratamiento** adecuado para salvar al paciente de la muerte o de secuelas importantes. El diagnóstico adecuado debe ser etiológico para poder adoptar el tratamiento específico.

Manifestaciones clínicas:

Las manifestaciones clínicas de los pacientes con una infección del SNC depende de los siguientes factores: agente causal, localización de la infección, duración de la enfermedad, edad y estado previo de salud del paciente.

La mayor parte de las infecciones del SNC se manifiestan como una enfermedad febril aguda o subaguda; los signos y síntomas más frecuente son cefaleas, náuseas, vómitos, alteración del nivel de conciencia o de las funciones mentales.

Este cuadro clínico se denomina **Síndrome meníngeo**. Las meninges inflamadas provocan una serie de signos, siendo los principales: rigidez de nuca, resistencia dolorosa a la extensión de la pierna mientras el muslo está flexionado (Signo de Kernig), y a la flexión de las rodillas a medida que se flexiona el cuello (Signo de Brudzinski).

Ante un cuadro clínico de estas características debe practicarse una punción lumbar (PL) para confirmar o descartar una posible meningitis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio del LCR

Recolección y transporte

En general el LCR se recoge insertando asépticamente una aguja en el espacio subaracnoideo a nivel de las vértebras lumbares. Se deben tomar 3 ó 4 tubos, que inmediatamente se emplearán para realizar recuento celular y diferencial, análisis microbiológico y químico.

El volumen de LCR es fundamental para la detección de ciertos microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* y *Cryptococcus neoformans*. Se recomienda emplear 10 ml por lo menos de LCR, cuando se sospecha que contiene estos patógenos. Generalmente se recogen entre 2 a 4 ml por tubo. Si el volumen de muestra es pequeño para el análisis

completo se centrifuga a 1500 g 30 min ó a 3000 g 15min a temperatura ambiente, se siembra el pellet y el sobrenadante se usa para análisis químico.

Las muestras de LCR deben ser llevadas inmediatamente al laboratorio; nunca deben ser refrigeradas. Si no se las procesa en el momento deben ser incubadas o dejadas a temperatura ambiente. Una excepción a la regla son las muestras de LCR para estudios virales, que pueden ser refrigeradas durante 24 h o congeladas a -70°C.

Análisis del LCR

Estudio fisicoquímico:

a) Aspecto: El LCR normal es cristalino e incoloro. En situaciones patológicas puede aparecer turbio, purulento, hemático o xantocrómico, o también viscoso y coagularse formando una fina película.

b) Recuento celular y diferencial: El LCR normal no contiene más de 4 linfocitos o células mononucleares por mm^3 . Un recuento entre 5 y 10 células/ mm^3 debe considerarse sospechoso, y por encima de 10 células/ mm^3 es demostrativo de inflamación leptomeníngea. No se encuentran eosinófilos en el LCR normal.

c) Glucosa: El nivel normal de glucosa en LCR es de 45-80 mg/dl y en pacientes con glucemia de 70-120 mg/dl. Dado que el nivel de glucosa en LCR depende del nivel sanguíneo, debe interpretarse en relación con la glucemia. Valores entre 40 y 45 mg/dl son casi siempre anormales y menos de 40 mg/dl o del 40% de la glucemia simultánea son invariablemente anormales.

d) Proteínas: La elevación de proteínas en el LCR es inespecífica en todos los tipos de inflamación del SNC. Cuando las proteínas están muy elevadas (más de 1g/dl) puede producirse una coagulación espontánea del líquido.

Estudio microbiológico

I- Examen microscópico:

El estudio del sedimento obtenido tras la centrifugación a alta velocidad de la muestra consigue más resultados positivos que el examen del frotis directo.

-Gram: Debe realizarse en todos los casos que hay sospecha de meningitis. Con los datos demográficos y clínicos del paciente y la morfología observada en el Gram puede determinarse presuntivamente la etiología de la mayoría de las meningitis bacterianas dentro de los 30 min. de la recepción de la muestra.

- Ziehl-Neelsen: Se efectúa en aquellos casos en que el cuadro clínico y otros hallazgos en el LCR sugieran la posibilidad de una meningitis tuberculosa.
- Tinta china: Está indicado cuando se sospecha de una infección por *Cryptococcus neoformans*. Realizar en paralelo la prueba de aglutinación con látex para *Cryptococcus*, ya que los pacientes con meningitis criptocócica tienen una célula de levadura por 20 ml de LCR.
- Frotis fresco: Para la demostración de amebas.
- Examen en campo oscuro: Cuando hay sospecha de meningitis sifilítica o leptospirósica.

II- Pruebas Inmunológicas:

Detección de antígenos bacterianos: las meningitis debidas a *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* pueden diagnosticarse mediante demostración de Ag capsulares específicos.

Detección de antígenos de hongos: para diagnóstico de *Cryptococcus neoformans*.

Contrainmunolectroforesis (CIE): se usa en algunos laboratorios para detectar antígenos contra *Listeria monocytogenes*.

III- Aislamiento de bacterias, hongos y parásitos (cultivos):

Medios de cultivo de rutina: deben incluir una placa de agar chocolate, una placa de agar sangre (5% de sangre de oveja), y un caldo para enriquecimiento, usualmente tioglicolato sin indicador. Las placas deben ser incubadas a 37°C en 5-10% de CO₂ durante por lo menos 72 h. El caldo se incuba a temperatura ambiente durante 5 días por lo menos. Debe inocularse una placa adicional de agar sangre en anaerobiosis. Si el Gram revela presencia de bacilos Gram negativos debe agregarse una placa de Mac Conkey.

Medios y técnicas especiales: están indicados cuando se sospecha una infección por *Mycobacteria*, *Brucella*, hongos o amebas.

IV- Determinación de anticuerpos

La determinación de anticuerpos en LCR es de utilidad en brucelosis, leptospirosis, sífilis, enfermedad de Lyme, meningitis y encefalitis virales, y en ciertas micosis y parasitosis.

V- Diagnóstico virológico

Deben recogerse 2 ml de LCR en tubo estéril conservándose a 4°C hasta que sean procesados para la demostración de antígenos, anticuerpos y aislamiento. En este caso se inoculan 0,25 ml de LCR en varios tubos con cultivo primario de riñón de mono, línea continua Hep-2 y cultivo diploide de fibroblastos de prepucio fetal humano. Estos cultivos se incuban a 35°C durante diversos períodos según cada sistema virus-célula.

VI- Estudios Complementarios:

Antes de iniciar el tratamiento deben realizarse cultivos de sangre, secreciones nasofaríngeas y pulmonares para bacterias y hongos, si éstas son posibilidades diagnósticas. La determinación secuencial de anticuerpos séricos puede aportar datos importantes en el caso de infecciones virales. Radiografías de cráneo, tórax y columna pueden ser útiles demostrando focos infecciosos adyacentes (parameningeos) o a distancia (neumonía, absceso pulmonar). El electroencefalograma (EEG), la Tomografía Computada (TC), y la imagen por resonancia magnética nuclear (RMN) pueden aportar datos sobre la etiología y posibles complicaciones que puedan desarrollarse a lo largo de la evolución.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Este práctico se realiza en forma teórica debido al elevado riesgo biológico de las muestras de LCR. Los alumnos realizarán una búsqueda bibliográfica actualizada del tema.

BIBLIOGRAFÍA

-Infecciones del Sistema Nervioso. Microbiología Clínica. Prats G. Ed. Médica Panamericana. 2006. España.

- Agüero G, Davenport MC, Del Valle MP, Gallegoz P, Kanneman AL, Bokser V, Ferrero F. Validación de una regla de predicción clínica para diferenciar meningitis bacteriana de meningitis aséptica Arch Argent Pediatr 2010; 108(1):40-44.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°8

INFECCIONES DE LAS VÍAS AÉREAS SUPERIORES

OBJETIVOS

- Reconocer los microorganismos de la microbiota habitual y los principales patógenos del tracto respiratorio superior.
- Adquirir criterios adecuados para la toma de muestra, procesamiento e interpretación de los resultados.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

El tracto respiratorio (TR) está en contacto directo con el medio ambiente y se encuentra expuesto continuamente a los microorganismos suspendidos en el aire que respiramos.

El aparato respiratorio está dividido anatómicamente en superior (TRS) e inferior (TRI). EL TRS comprende: la boca, fosas nasales, orofaringe, nasofaringe y senos paranasales. Otra clasificación incluye al oído medio por la comunicación estrecha que existe entre éste y la nasofaringe. Diversos mecanismos no específicos protegen el tracto respiratorio de las infecciones, entre ellos, se señalan: mucus, inmunoglobulina A secretora y sustancias antibacterianas como la lisozima presente en las secreciones respiratorias. Los reflejos mecánicos como la tos, el estornudo y la deglución contribuyen en la eliminación de agentes extraños; por otra parte, la microbiota "normal" de la nasofaringe y orofaringe previene la colonización del tracto respiratorio por microorganismos patógenos.

Microbiota habitual del aparato respiratorio

A- BOCA: *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos y variedades anaeróbicas son raros en la boca predentada, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pyogenes* están presentes en un pequeño porcentaje (5-10%) en bocas normales de adultos, Peptoestreptococcus, *Streptococcus pneumoniae*, especies de Neisseria, Veillonella, *Branhamella catarrhalis* y corynebacterias aerobias, *Actinomyces bifidus* y *Actinomyces israeli*, lactobacilos, *Haemophilus influenzae*, y *parainfluenzae*, *Bacteroides fragilis* y *Fusobacterium*.

B- GARGANTA-NASOFARINGE-BUCOFARINGE-AMÍGDALAS: Micrococos, estafilococos coagulasa negativos, micrococos anaerobios, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y Neisserias. Especies de Veillonella, corynebacterias y *Actinomyces israelii*, *Haemophilus influenzae*, especies de bacteroides no frágilis y *Fusobacterium*, vibriones salivales.

C- NARIZ: Estafilococos coagulasa negativos y *Staphylococcus aureus* en portadores. *Streptococcus viridans* (raro), *Enterococcus faecalis* y otras bacterias no son raras en los niños. *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* (ocasionalmente). Corynebacterias aerobias.

D- ÁREAS GENERALMENTE ESTÉRILES: Laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos, alveolos y senos nasales accesorios y pulmones.

Las infecciones de vías respiratorias superiores afectan a la población en general, son causa frecuente de consulta médica, sobre todo en la edad pediátrica, provocando ausentismo escolar y laboral. Las ITRS involucran a la cavidad nasal, faringe y senos paranasales. El 80% de estas infecciones son de etiología viral, en segundo lugar son producidas por bacterias y un reducido número de casos son de origen micótico.

Manifestaciones clínicas

- **Rinitis:** es la manifestación clínica característica del resfrío común, se presenta con aumento de la secreción nasal, la cual suele ser clara y acuosa al inicio, conforme avanza el cuadro puede sobreagregarse una infección bacteriana; en estos casos la secreción se vuelve espesa o purulenta, requiriendo tratamiento con antibióticos. La rinitis alérgica cursa igualmente con aumento de secreción nasal, necesitándose el diagnóstico diferencial que oriente el tratamiento adecuado.

- **Faringitis o amigdalitis:** se manifiestan con dolor faríngeo, eritema y edema de los tejidos afectados; puede existir exudado, petequias hemorrágicas y placas de células inflamatorias, presentes frecuentemente en la infección bacteriana. La observación de vesículas y lesiones ulcerativas son comunes en las infecciones virales.

- **Sinusitis:** Posterior a una infección nasofaríngea, por contigüidad puede afectarse una o más cavidades paranasales. La sintomatología cursa con obstrucción nasal, rinorrea,

dolor facial, cefaleas y fiebre. En los niños el síntoma característico es la rinorrea, que simula un resfriado común. Se debe sospechar de una sinusitis cuando los síntomas perduran por más de 10 días.

- **Otitis externa:** se define como la infección aguda o crónica del oído externo. Los factores de importancia en la patogenia de la otitis externa incluyen: traumatismo local, furunculosis, cuerpos extraños, o humedad excesiva, que causa maceración del epitelio del oído externo (oído del nadador). Algunas veces se desarrolla otitis externa como extensión de una infección del oído medio, con drenaje purulento a través de la membrana timpánica perforada.

- **Otitis media aguda (OMA):** es una inflamación de la cavidad del oído medio asociada a una infección aguda, con acúmulo de líquido generalmente purulento y que se asocia a síntomas como: otalgia, fiebre, irritabilidad, anorexia, vómito y disminución de la audición. Es una complicación frecuente (30%) de las infecciones agudas de las vías respiratorias en niños de 3 meses a 3 años de edad, que se incrementa en aquellos que asisten a guardería.

Etiología de las infecciones del tracto respiratorio superior

El 80% de las ITRS son de etiología viral. La causa bacteriana más frecuente de **faringitis** aguda es *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* β hemolítico grupo A) especialmente en niños de edad escolar.

S. pyogenes coloniza la zona orofaríngea de niños sanos (portadores asintomáticos) en un 15 a 20 % de los casos. En cuadros de faringitis se aísla en un 40-50 % de los niños y en un 10-20 % de los adultos. Entre otras bacterias causantes de faringitis encontramos Estreptococos beta-hemolíticos de los grupos C- G y F.

Otros agentes etiológicos poco frecuentes lo constituyen: *Arcanobacterium haemolyticum* y *Neisseria gonorrhoeae*, esta última debe ser considerada en jóvenes y adultos como consecuencia del contacto buco-genital.

En pacientes inmunocomprometidos, se debe informar el hallazgo de *Candida* sp., bacilos Gram negativos y *S. aureus*.

Tanto en la **sinusitis** como en **otitis media**, los microorganismos etiológicos frecuentemente implicados son: *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y, en menor proporción *M. catarrhalis*.

Otras manifestaciones menos frecuentes incluyen la formación de pseudomembranas, constituidas por tejido necrótico, células inflamatorias y bacterias.

Estas formaciones pueden orientar el diagnóstico hacia difteria faríngea o una Angina de Vincent.

Angina de Vincent (Gingivitis necrotizante)

Es una afección pseudomembranosa de la faringe o de las amígdalas. Se caracteriza por estar acompañada de hemorragia gingival, aliento fétido y dolor. Puede haber fiebre, anorexia y síntomas gastrointestinales. La pseudomembrana es grisácea, generalmente unilateral y, a diferencia de la diftérica es fácil de desprender con el hisopo.

Los agentes etiológicos de esta enfermedad son fusobacterias anaeróbicas (*Fusobacterium spp.*) asociadas a espiroquetas (*Borrelia spp.*). Estos microorganismos se tiñen como Gram negativos. Un examen directo positivo en un paciente que no presente el cuadro clínico característico no tiene ningún valor diagnóstico por cuanto fusobacterias y espiroquetas existen como parte de la flora orofaríngea habitual.

Difteria

Características clínicas de la enfermedad

Se trata de una enfermedad en remisión en la mayor parte de los países del mundo. Sin embargo, todavía hoy aparecen casos esporádicos y hasta brotes epidémicos en algunas regiones (p.ej. Rusia y países ex –integrantes de la Unión Soviética). El agente etiológico es *Corynebacterium diphtheriae*. La localización más frecuente es la orofaríngea. Los síntomas son malestar, odinofagia, dolor punzante aunque leve, fiebre baja y pseudomembrana extensa que puede involucrar amígdalas, pilares y úvula, prolongándose hasta el paladar blando, oro y nasofaringe. La pseudomembrana es primero blanca, luego grisácea, apergaminada con partes verdosas o negras. Puede progresar hacia la laringe produciendo cuadros de asfixia. La elaboración de toxinas por parte de la bacteria está condicionada por la lisogenia con un bacteriófago llamado beta. Produce complicaciones tóxicas en todos los tejidos pero particularmente en tejido cardíaco (miocarditis) y sistema nervioso (parálisis local del paladar blando, faringe posterior, neuropatías craneales y neuritis periféricas).

MATERIALES Y MÉTODOS

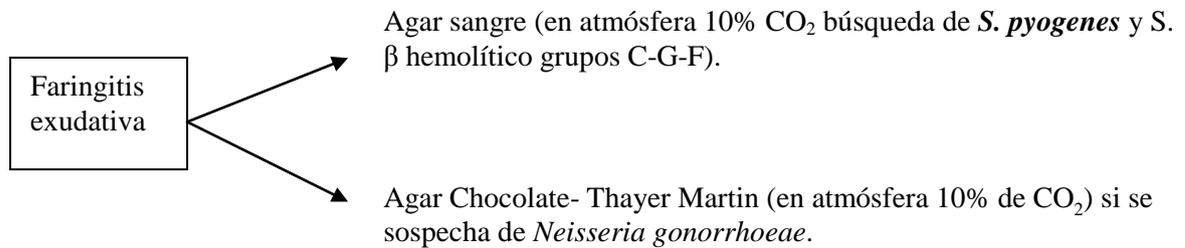
Toma de Muestras

Exudado de fauces

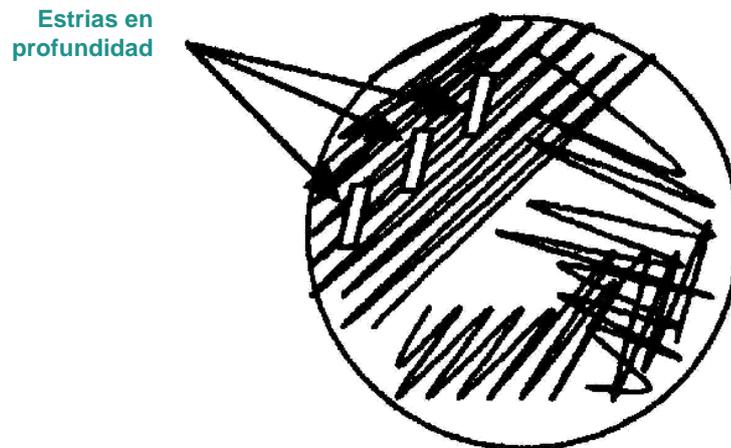
Se debe ejercer presión con un baja lenguas e hisopar enérgicamente la zona afectada, (placas purulentas, ulceraciones, zonas de enrojecimiento) evitando tocar con el hisopo

la lengua, paredes de la boca y saliva; el hisopo se coloca en un medio de transporte de Stuart y se remite dentro de las 12 h de realizado.

En caso de pseudomembrana, desprender ésta con pinza de Kocher y remitirla inmediatamente en tubo estéril.



Para la siembra se utiliza una placa entera de agar sangre, aunque si la siembra se efectúa con cuidado, es posible emplear sólo media placa. Se frota el hisopo en una superficie de unos 3 x 2 cm, cercana al borde de la placa. Con el ansa se disemina por toda la placa (o por media placa) con tres o cuatro estrías cruzadas. Luego, se hunde el ansa en el agar efectuando pequeñas estrías oblicuas.



Exudado de fauces. Esquema de siembra

Esto último se hace porque la estreptolisina O, una hemolisina que producen todas las cepas de *S. pyogenes*, presenta labilidad al oxígeno. Otra hemolisina, la estreptolisina S, es estable pero no es producida por todas las cepas. De este modo aquellas colonias pertenecientes a cepas carentes de estreptolisina S mostrarán una hemólisis muy débil al crecer en superficie bajo una atmósfera normal. Sin embargo podrían desarrollar una hemólisis evidente al crecer en la zona subsuperficial de estas estrías.

Las colonias típicas son circulares, de borde entero, de diámetro variable (0,5-2 mm). Pueden presentar tres formas diferentes: “mate”, “mucosa” y “brillante”. Las “mucosas” son grandes y con un brillo que las asemeja a gotas de agua. Son viscosas y a veces producen un crecimiento confluyente. Se trata de cepas que producen grandes cantidades de sustancia capsular (ácido hialurónico) y que han sido asociadas a brotes de fiebre reumática (serotipo M 18). Las colonias “mate” son chatas, con una superficie irregular, rugosa, A menudo son colonias “mucosas” envejecidas y colapsadas. Las colonias “brillantes” son más pequeñas, convexas, con una superficie lustrosa, Se trata de cepas que no producen cápsula. El tamaño de la zona de hemólisis es de dos a cuatro veces el diámetro de la colonia. En algunas cepas es mayor y en otras apenas un pequeño halo.

Identificación de *S. pyogenes*

Las colonias hemolíticas deben ser identificadas según las técnicas convencionales.

- Coloración de Gram \Rightarrow Cocos Gram positivos
- Prueba de catalasa \Rightarrow Negativa
- Prueba de bacitracina \Rightarrow Positiva (sensible)
- Prueba de PYR \Rightarrow Positiva

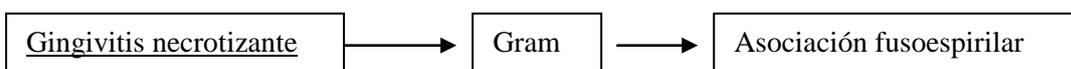
Métodos rápidos de diagnóstico de faringitis por estreptococos beta-hemolíticos del grupo A

Existen más de 40 productos comerciales destinados al diagnóstico rápido de estreptococos del grupo A a partir de exudados faríngeos. Estos emplean técnicas de extracción del antígeno específico de grupo y el posterior revelado por coaglutinación, aglutinación con partículas de látex o enzimoimmunoensayo.

Estas técnicas por lo general tienen una buena especificidad, pero una mala sensibilidad (<90%). De esta manera resulta imprescindible efectuar el cultivo de aquellas muestras que hubieran dado un resultado negativo con el método rápido elegido.

Diagnóstico Microbiológico de:

- **Angina de Vincent (Gingivitis necrotizante)**

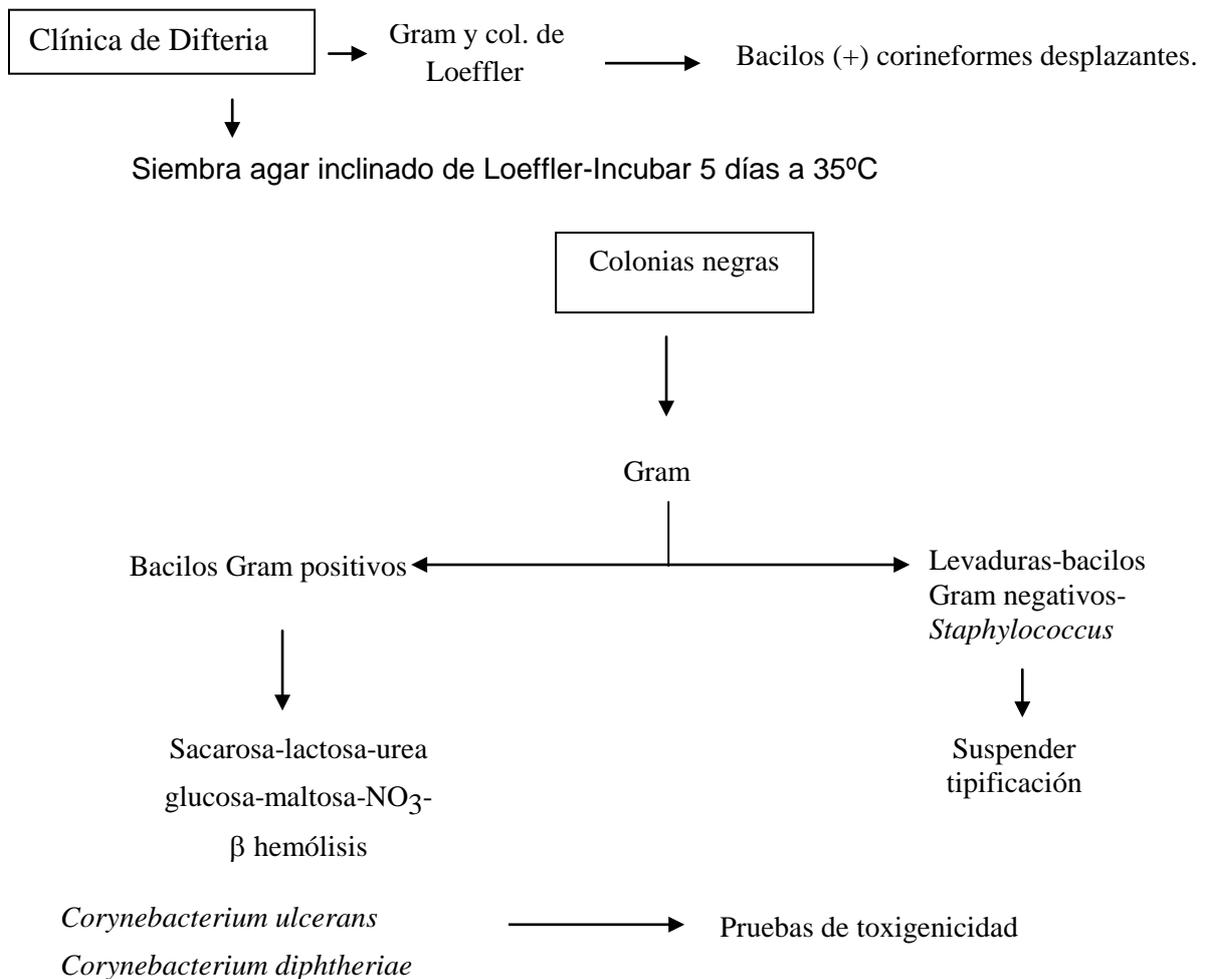


- **Difteria**

Tomar un hisopado de la lesión tratando de arrancar parte de la membrana. Generalmente no se consigue y se debe proceder con pinzas ad-hoc. En uno u otro caso se observa sangrado.

Examen directo:

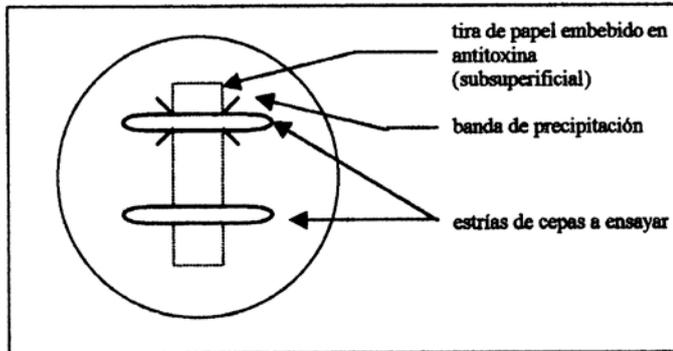
Con la coloración de Gram se observan bacilos Gram positivos en V, empalizada o letras chinas (difteromorfos). Con azul de metileno (30 segundos) se pueden observar los típicos gránulos metacromáticos.



Prueba de toxicidad (método de Elek)

Esta prueba consiste en impregnar un papel de filtro con antitoxina diftérica e incluirlo por debajo de la superficie de una placa de agar antes que solidifique. Las cepas a ensayar se estraían sobre la superficie del agar perpendicularmente a la tira de papel, del modo que se muestra en la figura. A las 24 h de incubación a 37° C se examinan las

placas con luz transmitida para observar la presencia de líneas de precipitación que aparecen en ángulos de 45° respecto de las estrías. Esto es indicativo de producción de toxina por parte de la cepa ensayada. Para clasificar una cepa como “no toxigénica” se debe incubar la placa por los menos durante 72 h.



Método de Elek

La cepa de la parte superior produce bandas de precipitación con la antitoxina, por lo tanto, se clasifica como toxigénica. La de la parte inferior, por el contrario, sería no toxigénica.

Coloración de Loeffler (Azul de metileno alcalino)

Solución A:

Azul de metileno	0,3 g
Alcohol etílico	30 ml

Disolver completamente, se trata de una solución saturada.

Solución B:

KOH	0,001 g
Agua destilada	100 ml

Disolver. Para su empleo volcar la solución A en la solución B, agitando continuamente y filtrar antes de su empleo.

Los gránulos se ven de color azul intenso o violeta sobre un fondo azul claro.

Medio de Loeffler

Extracto de carne	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Peptona	10 g
Glucosa	10 g
Agua destilada	1.000 ml

pH:7-7,2

Esterilizar a 120°C durante 15'. Asépticamente se toma una parte del caldo anterior ya frío y se le agregan tres partes del suero de caballo o vacuno, el cual también fue obtenido en condiciones asépticas. Se envasa en cantidad suficiente para inclinar y se coagula a 80°C media hora.

TABLA

	Nitrato	Ureasa	Glu	Mal	Sac	Almidón	Threa	Glucógeno
<i>C. diphtheriae</i> (mitis)	+*	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. diphtheriae</i> (gravis)	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>C. diphtheriae</i> (intermedius)	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. ulcerans</i>	-	+	+	+	-	+	+	-/+
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+/-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. xerosis</i>	+	-	+	+/-	+	-	-	-
C. group JK	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-
<i>Actinomyces pyogenes</i>	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	NR
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	-	-	+	+	+/-	+/-	+/-	NR

* *C. diphtheriae* (mitis, cepa belfanti) es Nitrato negativo.

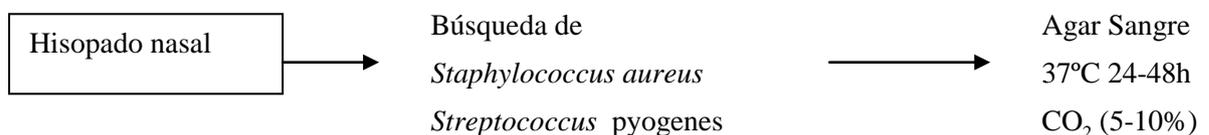
NR: no realizada

+/- : variable (la mayoría de las cepas +).

-/+ : variable (la mayoría de las cepas -).

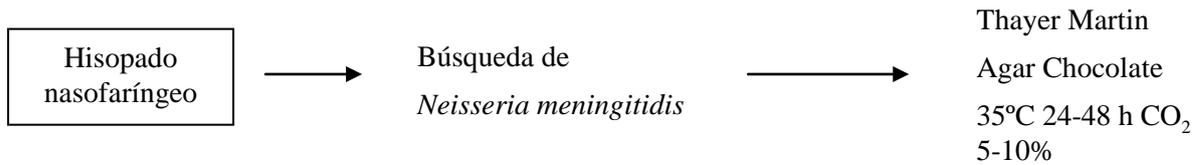
Hisopado nasal

Introducir el hisopo hasta llegar a cornetes y remitir la muestra en medio de transporte.

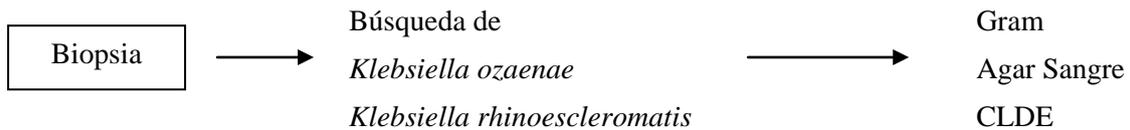


Hisopado nasofaríngeo

La muestra se toma de nasofaringe con hisopo flexible. Si se observa perforación o destrucción de tabique nasal, la muestra de elección será tomada por biopsia.



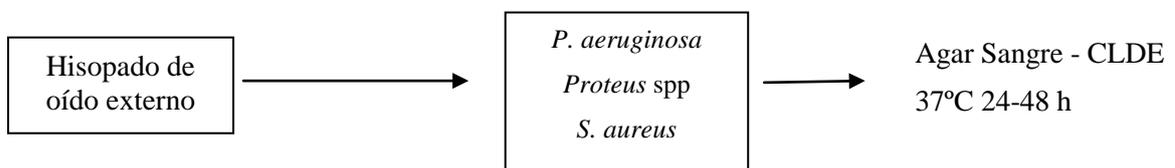
Cuando es necesario, realizar una **Biopsia**



Hisopado de oído externo

Es útil en el caso de otitis externa y podría ser ayuda en el caso de otitis media con perforación de membrana. Se deben realizar lavados previos con solución fisiológica estéril y luego hisopar, estos lavados se realizan ya que es un material de compleja interpretación debido a la frecuente contaminación de la muestra.

El material se envía en medio de transporte adecuado.



Abscesos amigdalinos y periamigdalinos

La única muestra representativa es la obtenida por punción-aspiración. Se remitirá con tapón de goma previamente flameado en el extremo de la aguja o introducir el material a un frasco de hemocultivo, luego se siembra en medios aerobios y anaerobios.

Punción de senos paranasales

Es el material de elección para demostrar la etiología de una sinusitis. Se debe jerarquizar el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*, Streptococcus β hemolítico, *Branhamella catharralis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* y anaerobios en general.

Punción de oído medio

La muestra se toma por timpanocentesis, la etiología a considerar es similar al ítem anterior. Útil para otitis media.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Obtener diferentes muestras de las vías respiratorias superiores: hisopado de fauces, hisopado de oído externo, hisopado nasal.
- Realizar examen en fresco y tinciones de las muestras (Gram).
- Sembrar las muestras en los medios de cultivo apropiados.
- Identificar las bacterias responsables de infecciones respiratorias.

BIBLIOGRAFÍA

- Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica panamericana, 2005. Argentina. Capítulo 124: Infecciones de las Vías respiratorias superiores. Pérez Trallero E, Anza Vicente D.
- Óscar Díeza, Nínive Batistaa, Ana Bordesb, María Lecuonac y Magdalena Lara A Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior *Enferm. Infec. Microbiol. Clin* 25(6):387-93. 2007.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº 9

INFECCIONES DE LAS VÍAS AÉREAS INFERIORES. TUBERCULOSIS

OBJETIVOS

- Adquirir criterios adecuados para la toma de muestra, procesamiento e interpretación de los resultados en infecciones del tracto respiratorio inferior.
- Evaluar los métodos bacteriológicos para el diagnóstico, tipificación y pruebas de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

El aire que inhalamos contiene millones de partículas suspendidas, incluidos algunos microorganismos que en su mayoría son inocuos, sin embargo, el aire constituye un vehículo para la transmisión de patógenos importantes. Aunque la vía respiratoria es un todo continuo desde la nariz a los alvéolos, es conveniente distinguir entre infecciones de las vías respiratorias superiores e inferiores. En este trabajo práctico estudiaremos estas últimas, las cuales tienden a ser infecciones más graves y la elección de un tratamiento antimicrobiano adecuado es importante para salvar la vida del enfermo. El tracto respiratorio inferior (tráquea, bronquios y pulmones) es un área normalmente estéril y la afección puede ocurrir por extensión de una infección de las vías respiratorias medias, aspiración de microorganismos patógenos que rebasan las defensas de las vías respiratorias superiores o, menos a menudo, por diseminación hematógena desde un sitio distante, como un absceso o una válvula cardíaca infectada. Las infecciones de las vías respiratorias inferiores se presentan con invasión y afección del pulmón, produciendo neumonía y alveolitis o pueden afectar la tráquea y bronquios ocasionando: traqueítis, bronquitis y bronquiolitis; estos cuadros se pueden presentar en forma aguda o crónica.

- La **bronquitis aguda** es una inflamación del árbol traqueobronquial, que se caracteriza desde el punto de vista clínico por tos, grado de fiebre variable y producción de esputo. Este último (material expulsado desde los bronquios, pulmones y tráquea, por la boca) a menudo es límpido al comienzo, pero puede tornarse purulento si la enfermedad persiste. Los principales agentes causales son: *Bordetella pertusis*, *Bordetella parapertusis*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*.

- La **neumonía** es un proceso inflamatorio que se caracteriza por la presencia de un infiltrado exudativo y celular en el parénquima pulmonar. La mayoría de las neumonías son de causa infecciosa y tienen una evolución aguda. Ocasionalmente, pueden tener un origen no infeccioso como en el caso de enfermedades autoinmunes, neoplasias o exposición a agentes tóxicos. Las neumonías pueden ser causadas por una gran variedad de microorganismos: bacterias, virus y hongos. Entre las bacterianas encontramos las producidas por: *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*.

Las neumonías pueden clasificarse según distintos criterios: a) de acuerdo a la etiología (según el microorganismo causal); b) según el lugar de adquisición (dentro o fuera del hospital), este último criterio es el más útil a la hora de establecer el tratamiento inicial de un paciente determinado.

Los síntomas que sugieren neumonía son fiebre, escalofríos, dolor en el pecho y tos con producción o no de esputo, dolor torácico, disnea, consolidación pulmonar: estertores, ruidos respiratorios disminuidos, infiltrados radiográficos y empiema. Es importante tener en cuenta que algunos pacientes con neumonía no muestran signos y síntomas relacionados con el tracto respiratorio. Por lo tanto, el examen físico del paciente, los hallazgos en la radiografía de tórax, los antecedentes del paciente y los resultados del laboratorio clínico son importantes. Del 10 al 30 % de los individuos con neumonía, además de los síntomas respiratorios, manifiestan dolor de cabeza, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea y mialgias.

Una vez establecido el diagnóstico clínico-radiográfico de infecciones del tracto respiratorio inferior es recomendable precisar el diagnóstico etiológico mediante pruebas de laboratorio adecuadas que permitan establecer la terapia antimicrobiana adecuada.

El diagnóstico etiológico puede efectuarse de diferentes maneras: en forma directa, con la identificación del agente causal; indirectamente, a través del hallazgo de un metabolito en particular y, más recientemente, utilizando técnicas inmunológicas y de biología molecular como herramientas en reacciones consideradas rápidas no convencionales.

Es muy importante tener en cuenta los datos epidemiológicos porque las infecciones del tracto respiratorio inferior se presentan a cualquier edad, aunque son más frecuentes en niños y ancianos. Asimismo, pacientes con enfermedades de base como diabetes, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cardíaca congestiva y enfermedades inmunosupresoras como el SIDA son más susceptibles a adquirirlas. Están especialmente predispuestas las personas con un bajo

nivel socioeconómico y en condiciones de hacinamiento sobre todo en patologías como **tuberculosis**.

Estos datos son fundamentales para orientar al microbiólogo hacia la búsqueda de determinados agentes.

- **Tuberculosis**

Enfermedad infecciosa, provocada por *Mycobacterium tuberculosis*, que se transmite a través del aire y que se caracteriza por la formación de tubérculos o nódulos en los tejidos infectados; puede afectar a diferentes órganos del cuerpo, en especial a los pulmones, produciendo tos seca, fiebre, expectoraciones sanguinolentas y pérdida de peso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

- ✓ Esputo o expectoración.
- ✓ Obtenidas por fibrobroncoscopia: cepillado bronquial, lavado broncoalveolar, lavado bronquial.
- ✓ Obtenidas por punción: transtraqueal, transtorácica y pleural.

Toma de muestra

Independientemente del método elegido para el procesamiento microbiológico, la muestra a seleccionar juega un papel importante en el éxito esperado, ya que toda información diagnóstica que el laboratorio pueda proporcionar, depende de la calidad de la muestra recibida.

Esputo

El paciente debe efectuar cepillado de dientes y gargarismos con solución de bicarbonato de sodio saturado, para disminuir contaminación con flora normal de boca, siendo éste un material de bajo rendimiento. Se obtiene la muestra por expectoración profunda, preferentemente matinal. Para ello, debe inspirar profundamente, reteniendo por un instante el aire de los pulmones y expeliéndolo con fuerza, repetir la operación hasta obtener no menos de tres esputos. Este procedimiento deberá realizarlo en un lugar ventilado.

La recolección la realizará en un envase descartable estéril, que debe ser de boca ancha con tapa de rosca, con capacidad para 30 – 50 ml y transparente porque permite ver la cantidad y la calidad de la muestra. De no producirse expectoración espontánea,

puede inducirse el esputo con nebulizaciones de solución fisiológica estéril (15 ml durante 10 minutos), siendo útil además realizar un drenaje postural o fisioterapia respiratoria. Enviar de inmediato al laboratorio, y si esto no es posible, conservar a 4 °C.

Procesamiento

Examen directo: para la realización del frotis se deben seleccionar las zonas más densas y purulentas del esputo.

Realizar fresco, coloración de Gram y Ziehl Neelsen. Un fresco y coloración de Giemsa para la búsqueda de elementos fúngicos.

La coloración de **Gram** se usa para el tamizaje del esputo antes de la realización del cultivo, permite controlar la calidad del esputo y determinar si la muestra es REPRESENTATIVA o no, lo cual es importante para evaluar el grado de contaminación con bacterias del tracto respiratorio superior, si la muestra proviene del tracto respiratorio inferior o si se obtuvo de la faringe o por aspiración de secreciones nasales o si es saliva solamente (Cuadro).

Cuando el médico sospecha de Tuberculosis y solicita baciloscopía para la búsqueda de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), se debe realizar un frotis y tinción de Ziehl Neelsen.

	Leucocitos	Células epiteliales planas	
Gram representativo 40X	25	10	Muestra representativa
Gram no representativo 40X	25 10-25 10	25 25 10	Muestra contaminada con saliva

La siembra de esputo se realiza en agar sangre, agar chocolate en atmósfera de CO₂ al 5-10%, CLDE e incubar a 37°C 24-48 h, si el Gram es representativo. En la interpretación, es fundamental correlacionar el examen directo con el cultivo (Cuadro). En el caso particular de aislar bacilos Gram negativos, para que este hecho tenga importancia clínica, deben aislarse además, de un líquido estéril (hemocultivo, líquido pleural, etc.) o bien 2 o 3 muestras sucesivas de esputo.

GRAM	DESARROLLO EN PLACA	PROCESAMIENTO	SITUACION
Representativo con germen desplazante	Germen único o predominante (concordante con el Gram)	Tipificación y antibiograma	1
No representativo y variedad de gérmenes sin predominio de ningún.	Flora polimicrobiana	No se realiza	2
No representativo más de 25 leucocitos, más de 25 células	Germen único o desplazante	Tipificación y antibiograma. Repetir la muestra. Interconsulta con el médico.	3
No representativo. Paciente neutropénico	No sirve	Hacer lavado broncoalveolar, lavado bronquial, punción transtraqueal, transtorácica. Biopsia pulmonar.	4
Representativo y un germen desplazante	Sin desarrollo	Posible tratamiento ATB previo. Suspender tratamiento.	5

Situación 1	Situación 2	Situación 3
		Germen predominante
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		25 células - 25 leucocitos
<i>Haemophilus influenzae</i>	Flora	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Polimicrobiana	tipificación y antibiograma
bacilos Gram negativos		
		Remitir nueva muestra

Streptococcus pneumoniae

Los neumococos son diplococos Gram positivos que pueden presentar cápsula o

estar desprovistos de ella. Su forma más característica es lanceolada aunque también pueden formar cadenas cortas o estar aislados. En medios líquidos, la mayor parte de las cepas capsuladas presentan un crecimiento difuso, mientras que las no capsuladas muestran un crecimiento granular. En agar sangre crecen presentando α hemólisis. Las cápsulas se observan cuando las colonias son tratadas con el anticuerpo específico de tipo, el cual, al combinarse con el polisacárido capsular, lo vuelve retráctil (reacción de Quellung).

Los neumococos son gérmenes exigentes que requieren un medio enriquecido para crecer y atmósfera de 5 % CO₂. Se han diferenciado más de 75 tipos serológicos de neumococos, por la existencia de polisacáridos inmunológicamente diferentes en sus cápsulas.

Diagnóstico de laboratorio:

Prueba de la optoquina: se usa el disco de optoquina para diferenciar entre *S. pneumoniae* (sensibles) y otras especies de estreptococos α hemolíticos (resistentes). La sensibilidad a la optoquina es una medida de la fragilidad de la membrana celular bacteriana. La optoquina, que es el clorhidrato de etilhidrocupreína, se utiliza impregnando discos con 5 μ g de la droga. Método: Se toma una suspensión de colonias puras en caldo Mueller Hinton o tioglicolato y con un hisopo se estría una placa de agar sangre de carnero al 5% (jarra con vela) durante 24 h a 35°C. Interpretación: Sensible, cuando hay inhibición del crecimiento alrededor del disco. Se considera como punto de corte 16 mm. Resistente, cuando el crecimiento no es inhibido alrededor del disco.

Prueba de la solubilidad en bilis: Se utiliza esta prueba para diferenciar entre *S. pneumoniae*, "soluble" en bilis y otras especies de estreptococos alfa hemolíticos, "insolubles" en bilis. Esta prueba controla la capacidad de las células bacterianas de producir lisis en presencia de sales biliares, en un tiempo y a una temperatura específica. Las sales biliares utilizadas con el desoxicolato de sodio o el taurocolato de sodio. Las sales biliares hacen descender la tensión superficial de la interfase medio-membrana, provocan una descomposición de la membrana celular y aceleran el proceso autolítico natural del neumococo activando las enzimas por combinación de las sales biliares con el neumococo.

Haemophilus influenzae

Son bacilos pequeños Gram negativos, inmóviles, no esporulados y pleomórficos, anaeróbios facultativos que producen la energía ya sea por oxidación o por fermentación.

Su crecimiento óptimo se obtiene incubando las placas en atmósfera de 5 % CO₂ a 35-37° C. Son bacterias fastidiosas y crecen solamente en medios enriquecidos (agar chocolate o agar chocolate suplementado) o con una fuente exógena de los nutrientes esenciales (satelitismo alrededor de una estría de *S. aureus*). Estos nutrientes esenciales son el factor X (hemina) y el factor V (NAD). Estas bacterias pueden poseer cápsula (cepas serotificables a, b, c, d, e, f) o no (cepas no serotificables).

Forman colonias pequeñas, translúcidas y ciertos biotipos presentan un olor característico por producción de indol a partir del triptofano.

Diagnóstico de laboratorio

Requerimiento de los factores V y X: se basa en la necesidad de *H. influenzae* de requerir ambos factores para su crecimiento. Método: se prepara una suspensión de las colonias aisladas en solución fisiológica. Se hisopa una placa de agar tripticase soja y se colocan 3 discos, uno impregnado en factor X, otro en factor V y el tercero con los dos factores. Se incuba a 37° C en CO₂ durante 24 h. Se observa crecimiento alrededor de los discos. *H. influenzae* requiere ambos factores para su crecimiento.

Secreciones endotraqueales

El procesamiento, las consideraciones y limitaciones son similares a las examinadas en el punto anterior.

Muestras obtenidas por procedimientos invasivos

Son recolectadas por médicos especialistas y transportadas al laboratorio para su procesamiento.

Mediante Fibrobroncoscopía

La fibrobroncoscopía tiene por objeto la obtención de muestras representativas del tracto respiratorio inferior correspondientes a la vía aérea o al segmento pulmonar radiológicamente afectado, sin contaminación con microbiota de la orofaringe o, al menos, con la menor contaminación posible. La indicación de la fibrobroncoscopía es el diagnóstico de la **neumonía nosocomial** y de modo particular de la **neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV)**, así como de la **neumonía del paciente inmunocomprometido**. Las muestras más empleadas son el cepillado con cepillo protegido (CEP) y el lavado broncoalveolar (LBA), pero también se emplea el lavado bronquial.

- **Cepillado con cepillo protegido (CEP)**

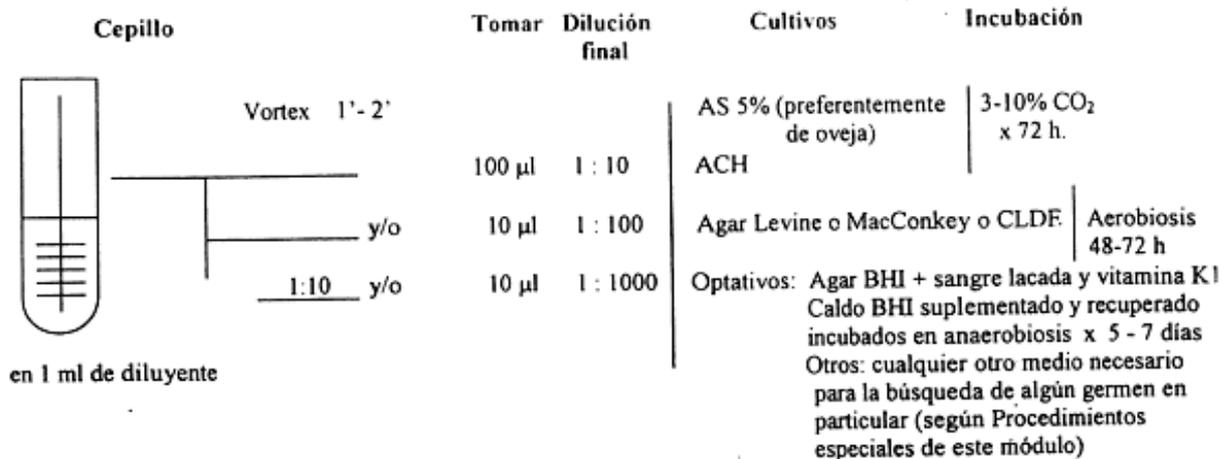
El material de bronquiolos distales se recoge con un cepillo ubicado dentro de 2 catéteres telescópicos (doble protección). El externo tiene el extremo distal ocluido con un tapón de cera que evita la entrada de las secreciones al catéter durante su avance a través del canal del fibrobroncoscopio. Una vez ubicado el catéter interno avanza y el tapón de cera es expulsado en la vía aérea, donde se absorbe. Finalmente se adelanta el cepillo a través del catéter interno y se obtienen las secreciones de los bronquiolos distales, aproximadamente de 0,001 a 0,010 ml. Una vez obtenida la muestra se vuelve a colocar el cepillo dentro del catéter interno, éste dentro del externo y se extraen del fibrobroncoscopio. Se limpia el catéter externo con etanol al 70%; se corta distalmente al catéter interno y al cepillo, se coloca en un frasco estéril y se envía de inmediato al laboratorio. Este método ha sido desarrollado para el estudio de la etiología de la **neumonía bacteriana** (Sensibilidad 33-100% y especificidad: 60-100%). El material del CEP NO está indicado para la búsqueda de micobacterias ni hongos sistémicos por la escasa cantidad de material que se obtiene. Tampoco es bueno para la recuperación de bacterias anaerobias a menos que se lo transporte y procese en forma anaerobia.

El examen bacteriológico debe realizarse en forma cualitativa y cuantitativa y son significativos los microorganismos aislados en un recuento $>10^3$ UFC/ml.

El umbral diagnóstico propuesto para los recuentos bacterianos se basa en el concepto de que la concentración de bacterias contaminantes en las secreciones de las vías inferiores es inferior a 10^4 UFC/ml. Como el cepillo recoge entre 0,01 y 0,001 ml de secreciones, el aislamiento de más de 10^3 UFC/ml en la muestra depositada en 1 ml de solución fisiológica representa entre 10^5 y 10^6 UFC/ml en la muestra original. Este punto de corte de 10^3 UFC/ml, establecido por comparación con los resultados de cultivos cuantitativos de biopsias de pulmón, indica una alta probabilidad de que exista una neumonía.

Se elegirán dos de las diluciones propuestas una vez realizada la agitación según el aspecto del diluyente: LÍMPIDO: sembrar las diluciones 1:10 y 1:100; OPALESCENTE: 1:100 y 1:1000 y TURBIO: 1:100 y 1:1000. A partir del diluyente una vez realizada la agitación realizar coloraciones de Gram y Giemsa. (Sensibilidad <50%).

Cepillo protegido. Esquema de procesamiento



Lavado broncoalveolar (BAL)

Primeramente se realiza anestesia local con lidocaína al 2% y se procede a introducir el fibrobroncoscopio óptico por vía orotraqueal o transnasal, recolectando la muestra del área que por radiografía haya demostrado infiltrados, para ello se instilan volúmenes variables de solución fisiológica estéril en cantidades que oscilan entre 20 y 100 ml. Después de cada instilación se hace una aspiración para recuperar el máximo volumen de líquido posible, formado por una mezcla de solución fisiológica y secreción broncoalveolar, enviándose inmediatamente en frasco estéril al laboratorio.

Para interpretar el cultivo se toman dos criterios restrictivos:

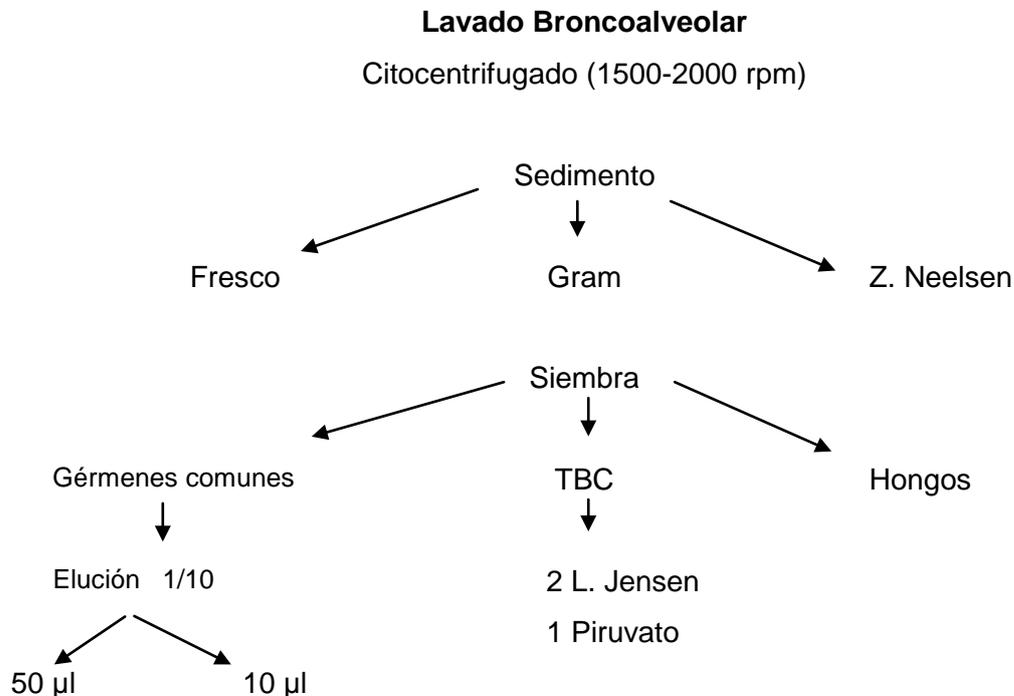
Las células epiteliales escamosas deben encontrarse en menos del 1% (mediante la tinción de Giemsa o de Gram).

El recuento de colonias debe ser $> 10^4$ UFC/ml.

Teniendo en cuenta estos puntos de corte la especificidad del BAL es del 100%, en tanto que la sensibilidad para todas las infecciones respiratorias bajas es del 88%. No obstante presenta limitaciones en cuanto al aislamiento de anaerobios y podría haber falsos negativos por el efecto bacteriostático de la lidocaína.

Hay que tener en cuenta además, que en infecciones intrahospitalarias la etiología suele ser mixta, entonces se debe considerar un Índice Bacteriano (IB) que se

calcula aplicando el logaritmo decimal al recuento de colonias de cada germen y sumando luego estos; por ejemplo, si tuviéramos 10^4 UFC/ml de *Escherichia coli* y 10^3 UFC/ml de *Klebsiella* spp el IB sería igual a 7 (3+4), en pacientes que no han recibido terapia antibiótica previa se considera representativo un IB > 6.



Agar sangre, Agar chocolate, (CO₂ 5-10%), CLDE

• Lavado bronquial

Consiste en la instilación de solución fisiológica estéril en un bronquio principal, seguida de una aspiración inmediata para recoger la muestra. La muestra recogida generalmente está contaminada con flora nativa orofaríngea. Su principal utilidad reside en la búsqueda de Micobacterias, siendo su valor muy limitado para el aislamiento de gérmenes comunes y hongos, no sirve para anaerobios.

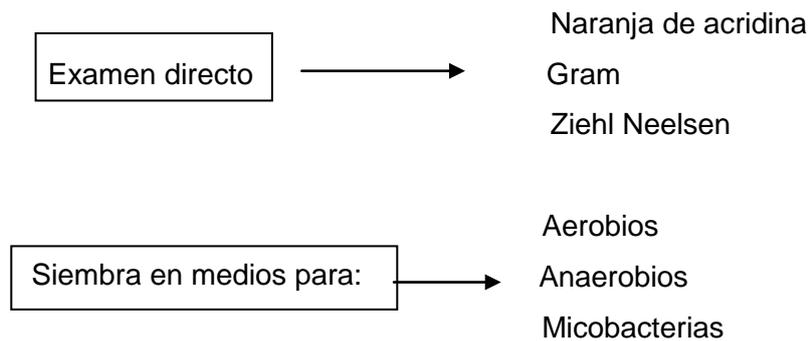
Materiales de punción

Punción transtraqueal-Punción transtorácica-Punción pleural: son las únicas muestras válidas para jerarquizar aislamientos de anaerobios en infecciones de las vías respiratorias bajas, pues evitan la flora nativa del tracto respiratorio superior, sin embargo tienen ciertas contraindicaciones (trastornos de coagulación, intubación orotraqueal) y complicaciones (neumotórax, colapso pulmonar) no obstante estos métodos invasivos pueden ser necesarios en caso de pacientes neutropénicos, los cuales necesitan un

diagnóstico rápido, ya que el esputo, tiene bajo rendimiento y problemas de interpretación pues la respuesta inflamatoria es muy pobre en estos pacientes.

Hay que recordar que los líquidos de punción son normalmente estériles, por lo tanto todo aislamiento debe ser considerado como potencial patógeno, aún en caso de flora mixta.

Procesamiento (jeringa y aguja con tapón de goma)



Aerobios:

Caldo hiperosmótico (incubar como mínimo 5 días a 37°C con repique a ciegas 24-48 h)

Agar sangre-agar chocolate (incubar 24-48 h 5-10% CO₂ a 37°C)

El caldo hiperosmótico permite el aislamiento de bacterias con pared alterada, preferentemente en pacientes tratados con antibióticos β lactámicos.

Anaerobios:

1 placa de agar sangre lacada (hemolizada) + hemina + vitamina K. (Incubar 72 h para descartar como negativo)

1 caldo cerebro corazón + vitamina K +hemina (Incubar 5-7 días antes de descartar)

Micobacterias:

2 Lowenstein Jensen

1 Piruvato

TUBERCULOSIS. Investigación de BACILOS ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTES (BAAR)

Manipulación y recolección de muestras:

- **Espuito:**

Es la muestra más utilizada, ya que la localización más frecuente de la infección es la pulmonar. Si el paciente expectora, se solicita la primera expectoración de la mañana. Si la expectoración es escasa se puede recoger la de 24 h. Se debe juntar la secreción bronquial, ya que la saliva o la secreción buconasal no son útiles.

Para una mayor posibilidad de aislamiento se recomienda recoger la muestra durante 3 días consecutivos (1 frasco por día).

Se proporciona al enfermo un frasco esterilizado de boca ancha. Es conveniente que el material no sobrepase 1/4 del volumen del recipiente. Mantener refrigerado hasta su procesamiento.

- **Hisopado faríngeo:**

Se utiliza en personas que no saben expectorar o no comprenden explicaciones: niños, enfermos en estado de inconciencia. Consiste en introducir un hisopo, embebido en agua destilada estéril, por la cara superior de la lengua hasta la faringe, con el paciente sentado frente al operador. Es conveniente realizar 2 o 3 hisopados en una misma sesión. El operador debe protegerse con máscara de celuloide u otro medio para evitar la infección.

- **Lavado gástrico:**

Tiene por objeto recoger esputos deglutidos inconcientemente. Se realiza introduciendo una sonda Levene fina; cuando se supone estar en el estómago se inyecta con jeringa 20 ml de agua destilada o SF estéril y se aspira con rapidez. Si el líquido fluye con facilidad es indicio que se está en cavidad gástrica.

Se aspiran aproximadamente 20 ml. El mejor momento para realizar el lavado gástrico es temprano por la mañana, antes del desayuno.

- **Otras muestras:**

Dada la variedad de localizaciones de la tuberculosis, diferentes muestras pueden ser remitidas al laboratorio para su examen, como: orina (recolección durante 24 h.), LCR, líquido pleural, pus de ganglios o abscesos, materia fecal, sangre menstrual, biopsia de endometrio, pieza de disección, líquido obtenido de lavado bronquial, etc.

Diagnóstico:

1. Evaluación de la Inmunidad celular por la prueba cutánea de la tuberculina (PPD)
2. Métodos bacteriológicos
 - 2.1 Baciloscopía directa
 - 2.2 Decontaminación, homogeneizado y cultivo

2.1 Baciloscopía directa

A partir de esputo u otro material sospechoso. Esta técnica es fundamental para la investigación bacteriológica de la tuberculosis, tanto para el diagnóstico como para el control de tratamiento. Esta observación microscópica debe cumplir dos objetivos: a) determinar si en el extendido hay bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) y b) establecer su número aproximado, esto tiene importancia ya que orienta sobre la eficacia del tratamiento.

Frotis y coloración

Se toma con el ansa preferentemente material purulento, caseoso o sanguinolento, y se extiende sobre un portaobjetos tratando de cubrirlo en su mayor parte. Fijar a la llama.

a) Microscopía no fluorescente

Coloración de Ziehl Neelsen

A- Solución de fucsina

Fucsina básica	1 g
Alcohol 96°	10 ml
Fenol	5 ml
A.D.	100 ml

B- Solución de alcohol-ácido

Alcohol 96°	97 ml
Acido clorhídrico	3 ml

C- Solución de azul de metileno

Azul de metileno	1 g
A.D.	1.000 ml

- 1- Cubrir el preparado completamente con una solución de fucsina básica (Rvo. A)
- 2- Calentar el frotis por la parte inferior con hisopo embebido en alcohol hasta desprendimiento de vapores (sin hervir). Repetir esta operación 3-4 veces dejando actuar el colorante no menos de 3'.
- 3- Decolorar con alcohol-ácido (reactivo B), hasta que no se desprenda colorante durante 30".

- 4- Lavar con agua.
- 5- Recolorar con azul de metileno (reactivo C), durante 1'.
- 6- Lavar con agua, secar y observar con objetivo de inmersión.

Lectura de Frotis: Cada frotis será examinado detenidamente observando por lo menos 200 campos microscópicos antes de informarlo como negativo.

Informe de baciloscopía según las normas nacionales recomendadas por OPS/OMS

- (-) No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes en 100 campos microscópicos observados.
- (+) Menos de un bacilo ácido-alcohol resistente por campo, en 100 campos microscópicos observados.
- (++) Uno a 10 bacilos ácido-alcohol resistentes por campo, en 50 campos observados.
- (+++) Más de 10 bacilos ácido-alcohol resistentes por campo, en 20 campos observados.

La baciloscopía es una técnica rápida, económica, que permite lograr una amplia cobertura de la población, por lo cual constituye un aporte importante para los programas de control de la tuberculosis, sin embargo, la visualización de BAAR en esputo no es afirmativo de *M. tuberculosis* porque otras micobacterias pueden causar enfermedad pulmonar, así como especies del género *Nocardia* que también pueden ser ácido alcohol resistentes. Sin embargo, una baciloscopía positiva en conjunción con la clínica y hallazgos radiológicos puede utilizarse para un diagnóstico presuntivo de micobacteriosis.

Es importante tener en cuenta que la no observación de BAAR en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de tuberculosis, ya que es una técnica de sensibilidad limitada. Se ha demostrado que son necesarios 5000 a 10000 bacilos/ml de esputo para el reconocimiento en la microscopía directa, en estos casos el cultivo detecta de 10 a 100 colonias de micobacterias viables.

b) Microscopía de fluorescencia

Coloración de auramina

A- Solución de auramina

Fenol	3 g
Auramina	0,3 g
Alcohol etílico	2 g
A. bidestilada. c.s.p.	100 ml

Calentar a 40°C hasta que se disuelva el fenol, agregar la auramina lentamente, agitando. Filtrar y conservar en botellas oscuras protegidas de la luz. Duración 6 semanas.

B- Solución de Alcohol-ácido

Alcohol de 96 °	97 ml
Acido clorhídrico	3 ml

C- Solución de permanganato

Permanganato de potasio	0,5 g
Agua bidestilada	100 ml

- 1- Fijar el frotis al calor.
- 2- Cubrir con el colorante auramina (reactivo A) 20'.
- 3- Lavar con agua corriente.
- 4- Decolorar con alcohol-ácido (reactivo B) 4'.
- 5- Lavar con agua corriente.
- 6- Cubrir con solución de permanganato (reactivo C) 30'.
- 7- Lavar, secar y observar con objetivo de 40 x en microscopía de fluorescencia.

Lectura de frotis

Los BAAR se observan de color amarillo o naranja contra fondo oscuro. El informe se realiza de la misma manera que en la coloración de Ziehl-Neelsen.

Para el cultivo de *M. tuberculosis* la muestra debe ser sometida a un procesamiento llamado homogeneizado, antes de sembrarse en el medio de cultivo.

2.2 Preparación del homogeneizado

Técnica de decontaminación y cultivo de Borda Bossana

- 1- En un tubo estéril con tapa a rosca o tapón de goma, mezclar partes iguales de muestra y sol. de NaOH 4%, agregar 5 gotas de sol. precipitante (Ba₂Cl +Ca₂Cl)
- 2- Agitar fuertemente 20 seg, incubar en estufa a 37°C, agitando a los 5 y 10 min. Dejar en reposo en la estufa 50 minutos.
- 3- Sacar el tubo de la estufa. Extraer, con pipeta estéril, 2 ml del precipitado del fondo

del tubo. **No pipetear con la boca, utilizar propipeta.**

4- Realizar un frotis (coloración de Ziehl Neelsen y Auramina)

5- Sembrar 0,5 ml del precipitado en cada uno de los tubos, 2 de Lowenstein-Jensen y 1 de Stonebrink acidificados y enriquecidos (piruvato).

6-Rotar los tubos para lograr una distribución pareja de la muestra en la superficie del medio. Colocar los tubos en una bandeja, con una inclinación aproximada de 5°. Colocar los tubos en la estufa de cultivo, si se trabaja con tubos con tapa a rosca, dejar floja la tapa para permitir la evaporación de la parte líquida de la siembra. Incubar a 37°C.

7- A las 72 h revisar los tubos. Si se ha evaporado el líquido, ajustar la tapa a rosca. Si son tubos con tapón de algodón, flamearlo, introducirlo con una pinza y colocar un tapón de goma. Si todavía están húmedos, incubar hasta que se sequen y luego cerrar. **Dejar incubando hasta 8 semanas.**

Informe de cultivos:

El informe del cultivo como el de la baciloscopía, no debe ser sólo cualitativo sino semicuantitativo, para los cuales se recomienda la escala siguiente:

(+++): Colonias confluentes (las colonias son tantas que cubren todo el medio)

(++): Colonias separadas (más de 100)

Nº: Si hay menos de 20 colonias se debe colocar el Nº de colonias contadas

(-): No se observan colonias.

- Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por ml de muestra clínica digerida y concentrada.

- Los aislamientos en cultivo puro son necesarios normalmente para poder identificar las especies de las cepas aisladas.

- Si la baciloscopía es un índice de la eficacia del tratamiento, el cultivo permite asegurar la negativización y curación del paciente.

Muestras que requieren un tratamiento especial

- Piezas quirúrgicas, biopsias y ganglios: triturar la muestra en un mortero. Si es necesario agregar una pequeña cantidad de arena y agua destilada estéril. La papilla es tratada con igual volumen de NaOH 4% y 5 gotas de solución precipitante. Continuar en el punto 2 de la técnica descrita.

- Orinas: agregar 1 ml de sol. precipitante a cada uno de los frascos con orina. Llevar a la heladera durante 24 h. Extraer con pipeta estéril 2,5 ml del precipitado de cada uno de los frascos y colocarlo en tubo estéril con tapa a rosca o tapón de goma. Agregar 5 ml de

Na OH al 4%. **No agregar sol. precipitante.** Continuar en el punto 2 de la técnica descripta.

Reactivos para el homogeneizado

- **Solución Decontaminante:** NaOH al 4%. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

- **Solución Precipitante:**

BaCl ₂ 2 H ₂ O	4,0 g
CaCl ₂ 6 H ₂ O	2,0 g
H ₂ O dest.csp	100 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

- **Medio de Lowestein Jensen**

Reactivo I:

Fosfato diácido de potasio	2,40 g
Sulfato de magnesio	0,24 g
Citrato de magnesio	0,60 g
Asparagina	3,60 g
Glicerina	12,00 g
A.D.	600 ml

Hervir 2 h., o autoclavar 120°C por 20'. Enfriar, Agregar fécula de papa 30 g (no se agrega en caliente pues forma grumos difíciles de disolver). Hervir, enfriar a 50-55°C.

Reactivo II:

Un litro de huevos (20-22 huevos), previamente lavados con agua y jabón y sumergidos 20' en alcohol de 96 grados. Mezclar los reactivos I y II agitando bien hasta completa disolución de los huevos.

Reactivo III:

Agregar 20 ml de verde de malaquita al 2% (en solución acuosa). Preparado el medio, se filtra por doble gasa estéril. Envasar en tubos taponados con algodón (estériles), coagular 50' a 85°C, cerrar los tubos con corchos parafinados o tapón de goma.

- Medio de Stonebrink modificadoA- Solución salina

Piruvato de sodio	1,25 g
Fosfato monopotásico	0,5 g
A.D.	75 ml

Añadir fosfato disódico hasta obtener un pH: 6,5

B- Huevos enteros: 200 ml

C- Solución colorante

Cristal violeta	25 mg
Verde de malaquita	200 mg
A. D.	25 ml

D- Cicloheximida ("Actidione")

Los huevos frescos se lavan con agua y jabón, se colocan luego en alcohol durante 15'. Los huevos se rompen en un recipiente estéril y se batan suavemente. Las soluciones salinas y de coloración se esterilizan bien en autoclave durante 20' a 120°C.

Las tres porciones arriba mencionadas se mezclan bien y se filtran a través de una gasa estéril (tres capas de gasa). Se agrega una pizca de cicloheximida.

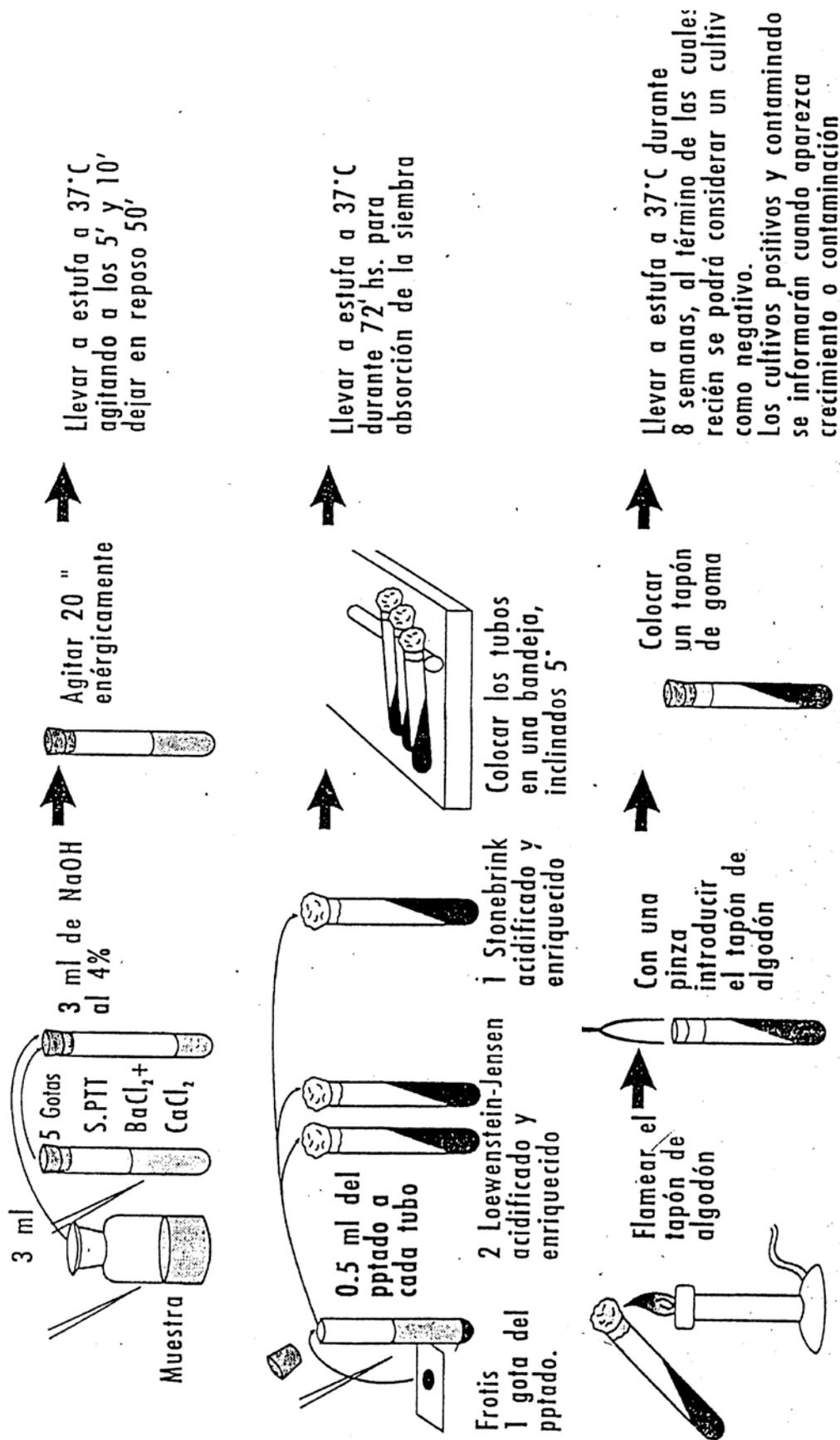
La mezcla final se distribuye en cantidades de 5 ml en tubos de ensayo.

El medio se deja coagular en posición inclinada a 80°C durante 30'.

El color del medio es azul intenso.

En este medio se desarrolla bien *Mycobacterium bovis*, que se ve inhibido por el glicerol en el medio de L.J.

En los últimos 20 años han aparecido métodos de cultivo en medio líquido con indicador de crecimiento que, si bien son más susceptibles de contaminarse, permiten el desarrollo en menos tiempo.



Tomado de: División Micobacterias. ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán

TIPIFICACIÓN DE BACILOS TUBERCULOSOS

Para la identificación preliminar de cepas de bacilos tuberculosos se realiza el estudio de las características macroscópicas de los cultivos y se emplean además pruebas biológicas y bioquímicas.

Al examinar el cultivo, la observación del tipo de desarrollo y de la morfología de las colonias en diferentes medios, incluyendo el de Lowestein Jensen, sirve como base para la clasificación.

En las pruebas biológicas, el método de tipificación se basa en demostrar la virulencia del microorganismo en cobayo, conejo y pollo.

Se dispone de varias pruebas "*in vitro*" para la tipificación de las diferentes especies de micobacterias, incluyendo pruebas para las características bioquímicas y físicas, pautas de sensibilidad a las drogas y métodos serológicos. Algunas pruebas bioquímicas (niacina, reducción del nitrato, actividad catalásica), son comúnmente usadas en la tipificación de rutina del bacilo tuberculoso.

Identificación Definitiva

Las micobacterias se pueden identificar de manera definitiva empleando una gran variedad de técnicas:

- Análisis cromatográficos de las características de los lípidos de la pared celular.
- Sondas moleculares específicas de especie.
- Amplificación de las regiones hipervariables de los genes del RNA ribosómico 16 S específico de especie.

Pruebas Bioquímicas para la diferenciación de micobacterias

1- Prueba de niacina

Fundamento:

Demuestra la presencia de ácido nicotínico que sólo es producido en cantidad importante por *M. tuberculosis* y no por el resto de las bacterias.

Reactivos

A- Solución acuosa al 10% de bromuro de cianógeno (conservar a 4 °C, no más de tres meses, en frasco oscuro).

B- Solución alcohólica al 4% de bencidina (conservar a 4 °C en frasco oscuro).

Técnica:

Se deben emplear cultivos en medio sólidos a base de huevos con abundante desarrollo y con más de un mes de sembrado. A cada tubo se le agrega 5 ml de agua destilada, se disgregan las colonias con un ansa y se dejan en posición inclinada a fin de que el agua esté en contacto con toda la superficie del cultivo, durante 15 min.

Luego se agregan 10 gotas de solución B y 10 gotas de solución A. Se agita ligeramente y se coloca en posición vertical durante 15 min.

Reacción positiva: color rojo violáceo

Reacción negativa: color blancuzco.

2- Prueba de la catalasa a temperatura ambienteReactivos:

A- Solución de Tween: preparar una solución al 10% de tween 80 en agua destilada. Esterilizar en autoclave, si sedimenta agitar.

B- Solución de peróxido de hidrógeno al 30%.

Procedimiento:

Volcar sobre un ml de una mezcla 1/1 de las soluciones A y B sobre la superficie del cultivo por probar, desarrollada en el medio de Lowestein Jensen.

Resultados:

Se considera positivo cuando hay desprendimiento de burbujas.

Todas las micobacterias son catalasa positiva a temperatura ambiente.

Las cepas resistentes a la isoniacida son catalasa negativa.

3- Prueba de la catalasa a 68°C:

Reactivos: igual que el anterior

Procedimiento:

Tomar con espátula varias colonias del cultivo, suspender en 0,5 ml de tampón fosfato M/15 a pH: 7. Calentar el tubo con la suspensión a Baño María a 68°C durante 20 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente, agregar 0,5 ml de la mezcla 1/1 de los reactivos A y B. Observar el desprendimiento de burbujas hasta 20 min.

Resultados:

En *M. tuberculosis* y *M. bovis*, la enzima catalasa, por calentamiento a 68°C 20 min. se inactiva dando esta prueba negativa. En las demás micobacterias esto no sucede, permaneciendo la prueba positiva.

4- Prueba de reducción de nitrato:Fundamento:

La reacción pone de manifiesto la presencia de nitritos producidos por reducción del nitrato en el caso de poseer la bacteria enzima nitrato reductasa.

M. tuberculosis posee esta enzima mientras que *M. bovis* y *M. avium* carecen de ella.

Reactivo:

Se emplea el reactivo de Griess

A- Solución I:

Acido sulfanílico	0,8 g
Acido acético	30 ml
A. D	100 ml

B- Solución II :

Alfa naftilamina	0,5 g
Acido acético	30 ml
A. D	100 ml

Técnica

Se debe efectuar sobre cultivos jóvenes. En tubo de hemólisis se emulsiona una ansada de colonias en 0,05 ml de agua destilada. Se agregan 2 ml de una solución M/100 (0,085%) de nitrato de sodio en agua destilada. Se incuba durante 2 h a 37°C. Se agregan 0,1 ml de cada una de las soluciones A y B del reactivo de Griess.

Reacción positiva: coloración roja.

Reacción negativa: coloración rosa suave.

En la actualidad se utilizan diversas técnicas moleculares como:

- Secuenciación
- Utilización de sondas para tipificación
- Amplificación directa a partir de muestras clínicas
- Sistemas moleculares de tipificación

La utilización de tecnología de ácidos nucleicos, por su rapidez, se presenta como

ideal para la detección y tipificación de micobacterias. El grupo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*) fue durante años el único de importancia médica. Con el cambio en el tipo de huéspedes (inmunosupresión terapéutica, SIDA, oncológicos, fibroquísticos), adquieren relevancia otras micobacterias como el complejo *M. avium – intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* y otras.

TRATAMIENTO Y PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Los **antibióticos** que integran el tratamiento antituberculoso estandarizado utilizado en nuestro país e internacionalmente son: isoniacida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) y etambutol (E) o estreptomicina (S). Se administra HRZ durante dos meses y se completa el tratamiento durante 4 meses más con HR. Durante la primera fase se puede (o se debe en ciertos casos) agregar E ó S.

La prueba de sensibilidad del bacilo de la tuberculosis es relativamente compleja y se debería realizar en los siguientes casos: Con antecedentes de tratamiento previo (especialmente si ha habido irregularidad en su cumplimiento); Coinfectados por el VIH (especialmente si tienen historia de interacciones previas); Contactos de pacientes que están afectados por tuberculosis multirresistente; Con mala respuesta al tratamiento (no negativiza la baciloscopía al tercer mes de tratamiento).

El **antibiograma** para *M. tuberculosis* requiere técnicas especiales, esto es debido a la lentitud con que crece y a la necesidad de cuantificar mutantes naturales resistentes en la población estudiada.

El método más utilizado es el **Método de la proporciones** de Canetti que consiste en evaluar la proporción de bacilos resistentes que existen en una población de *M. tuberculosis*.

- Se debe usar un inóculo que sembrado en la superficie del medio Lowestein Jensen, dé un número abundante de colonias pero fácilmente contables. Se siembra en tubos con medio L-J con antibiótico y sin antibiótico. Así, se pueden contar las colonias crecidas en ambos medios y deducir la proporción de bacilos resistentes sobre la totalidad de la población bacilar estudiada.

- La cepa es resistente al antibiótico si el número de mutantes resistentes es superior al 1%

Técnica

Se recogen colonias desde un cultivo y se suspenden en agua destilada ajustando a la opacidad de un testigo que contiene 1 mg/ml de bacilos. A partir de allí se realizan

diluciones 10^{-3} y 10^{-5} .

- De cada dilución se siembran 0,2 ml en 2 tubos con medio L-J sin antibiótico y 1 tubo con el medio adicionado de cada concentración de antibiótico (0,1; 0,2; 1,0 $\mu\text{g/ml}$). Incubar los tubos a 37°C , en posición inclinada durante 28 a 45 días.

- Contar las colonias en los distintos tubos y deducir la proporción de bacilos resistentes que existen en la cepa.

Ejemplo:

Dilución	testigo (s/antibiótico)		H* $\mu\text{g/ml}$		
			0,1	0,2	1,0
10^{-3}	∞	∞	∞	∞	∞
10^{-5}	30	36	34	4	0

*H: Isoniacida

Nº de bacilos sembrados (viabiles): $\frac{36 + 30}{2} = 33$ bacilos

En los tubos con antibióticos se sembró la misma concentración de bacilos.

- En el tubo con 0,1 $\mu\text{g/ml}$ crecieron 34 colonias $\rightarrow 34/33 \times 100 \approx 100\%$ de resistencia a esa concentración.
- En tubo con 0,2 $\mu\text{g/ml}$ crecieron 4 colonias $\rightarrow 4/33 \times 100 \approx 12\%$ de resistencia a esa concentración.

Confrontar la proporción obtenida con la proporción crítica (tablas) adoptada para cada antibiótico. Si la proporción de resistencia obtenida para la cepa en estudio es igual o mayor que la proporción crítica correspondiente, la cepa es resistente.

Ejemplo: para Isoniacida

Concentración	Proporción crítica (%)
0,1	10
0,2	1 Como resultó 12%, es resistente

Mediante esta metodología el tiempo promedio requerido desde que se procesa la muestra hasta la obtención del resultado es de 60 días.

Otros métodos

Se han adaptado para practicar antibiograma, el sistema radiométrico BACTEC u otras técnicas automatizadas en medio líquido con resultados fiables y más rápidos (30 días).

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Procesar una muestra de esputo.
- Realizar examen en fresco y tinciones de las muestras (Gram, Giemsa, Ziehl-Neelsen).
- Sembrar las muestras en los medios de cultivo apropiados.
- Identificar las bacterias responsables de infecciones respiratorias.
- Muestra de trabajo: esputos negativos para BAAR, inoculados con una suspensión de un cultivo puro de *Mycobacterium smegmatis*.
- Realizar coloración de Ziehl-Neelsen a partir de la muestra de trabajo. Observar bacilos ácido alcohol resistentes en microscopio óptico (100X).
- Procesar la muestra por la técnica de decontaminación y cultivo de Borda Bossana.

BIBLIOGRAFÍA

- Diagnóstico y tratamiento de la Tuberculosis Ruiz Manzanoa J., Blanquerb R., Calpec JL., Caminerod JA., Caylàe J, Domínguezf JA., García JM y Vidalh R. Arch Bronconeumol. 2008; 44(10):551-66.
- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Capítulo 29. *Mycobacterium*. Edit. Elsevier España, S.A. 5º edic. 2006.
- Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana, 2007. Argentina. Infecciones de las Vías respiratorias inferiores. Begoña Cacho J., Meseguer Peinado MA., Oliver Palomo A., Puig de la Bellacasa J.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO N°10

BRUCELOSIS

OBJETIVO

- Adquirir conocimiento del manejo del diagnóstico bacteriológico y serológico de las muestras clínicas implicadas en brucelosis.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias pertenecientes al género *Brucella*, que ocasiona problemas de salud importantes entre los individuos que ingieren alimentos contaminados o mantienen un estrecho contacto con el ganado.

Morfológicamente, las Brucelas son pequeños cocobacilos, Gram negativos, de 0,5-0,7 μm de diámetro y 0,6-1,5 μm de longitud, no capsulados, no esporulados, inmóviles, de localización intracelular. Son aerobios estrictos; algunas de ellas requieren una atmósfera de 5-10% de CO_2 . Temperatura óptima 37°C, pH óptimo 6,6-7,4. Desarrolla muy lentamente en medios comunes, en cambio el crecimiento se ve favorecido en medios enriquecidos.

Diagnóstico:

- Clínico presuntivo: considerando los datos epidemiológicos, anamnésicos y observación clínica.
- Laboratorio: cultivo y pruebas serológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO

Aislamiento

Las cepas se pueden recuperar a partir de sangre, médula, líquido cefalorraquídeo, líquido articular, biopsias u otros materiales. La toma de la muestra se debe hacer lo antes posible para que el tratamiento con antibióticos no interfiera en el resultado. Se recomiendan tres muestras en medio de cultivo monofásico o una en medio de cultivo de equipo automatizado, en un período de 24 h, preferentemente durante la etapa febril del paciente. La incubación se realiza a 36°C en atmósfera con 10 % de CO_2 .

Generalmente los hemocultivos requieren un período de incubación prolongado, por esa razón no se descartan como negativos antes de los 30 días. Las colonias, pequeñas, translúcidas y de bordes lisos, se pueden visualizar en un medio de cultivo sólido a partir de las 48 h de incubación.

Medios de cultivo

El citrato de sodio al 2,5% adicionado al medio de cultivo líquido, resulta un anticoagulante que no interfiere en el aislamiento de *Brucella* mientras que los medios de cultivo sólidos son apropiados para la observación de la morfología de las colonias.

El suero dextrosa agar (SDA) es uno de los más usados porque permite el aislamiento de la mayoría de las especies. El N-Z-amine-primatone (NZP) desarrollado en el Centro Panamericano de Zoonosis, OPS-OMS, se usa con muy buen resultado. Es muy ventajoso por su bajo costo, buen rendimiento y porque la disociación de las colonias es mínima. De los medios de cultivo comerciales deshidratados, el *Brucella* Agar BBL, se recomienda para el crecimiento de la mayoría de las especies y con el agregado de 3-5% de suero equino se logra el crecimiento de todas las especies.

Si el material está contaminado se puede emplear el medio de cultivo básico adicionado de antibióticos, aunque las cepas de *Brucella* muy sensibles pueden ser inhibidas. Es recomendable sembrar el material por duplicado en el medio básico y en el medio con el suplemento de antibióticos.

Suero dextrosa agar (SDA)

Agar base	4 g
Agua destilada	100 ml

Disolver en Baño María y esterilizar en autoclave a 121°C. Enfriar a 56°C y agregar 5 ml de suero equino esterilizado por filtración que contenga dextrosa al 20% p/v.

Agar brucella

Digesto pancreático de caseína	10 g
Digesto péptico de tejidos animales	10 g
Autorizado de levaduras	2 g
Glucosa	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Bisulfito de sodio	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH 7

Medio básico con suero equino (BDS)

Al Agar Brucella esterilizado en autoclave y enfriado a 56°C, agregar suero equino al 3% previamente esterilizado por filtración.

N-Z-amine-Primatone

N-Z-amine(Humko Sheffield):	16,25 g
Primatone (Humko Sheffield):	5,41 g
Extracto de levaduras:	8,00 g
Dextrosa:	24,00 g
Fosfato monosódico (PO ₄ H ₂ Na.H ₂ O):	3,16 g
Fosfato disódico(PO ₄ HNa ₂)	1,06 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver las peptonas en agua destilada, calentar a 80°C durante 2 h. Dejar enfriar y agregar el resto de los componentes. Ajustar el pH a 6.4-7.0 y esterilizar por filtración. Controlar la esterilidad del medio a 36°C durante 72 h.

Caldo para hemocultivos

A medio básico Brucella Broth (BBL) preparado de acuerdo a las instrucciones del envase, agregar citrato de sodio al 2.5% y esterilizar en autoclave a 121°C. Una vez enfriado a 56°C agregar suero equino al 3 % previamente esterilizado por filtración. Distribuir estérilmente 20 ml en frascos de 50 ml, colocar tapones de goma y casquete metálico e incubar invertidos durante 72 h.

Medio de Kuzdas Morse

A 100 ml de medio básico estéril y enfriado a 56°C agregar 100 mg de cicloheximida, 25000 UI de bacitracina y 6000 UI de polimixina B, esterilizadas por filtración. Previamente preparar soluciones concentradas en agua destilada de los antibióticos. La cicloheximida debe ser disuelta en 1 ml de acetona antes de completar el volumen con agua destilada.

Métodos de coloración

Se tiñen con coloración de Gram, pero son también ácido-alcohol resistentes, usándose la tinción de Ziehl-Neelsen modificada:

- Se realiza un frotis, se fija.
- Teñir durante 10 min con una dilución 1/10 de solución madre de fucsina fenicada de Z-N (solución madre: 1gr. de fucsina básica, en 10 ml de alcohol absoluto, 90 ml de solución de fenol al 5%). No se calienta.
- Lavar con agua corriente.
- Decolorar con ácido acético al 0,5% por 30 seg. Acido débil.
- Lavar.
- Colorear con azul de metileno al 1% por 20 seg.
- Las brucelas aparecen teñidas de rojo sobre un fondo azul.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para diferenciar biotipos se utilizan las pruebas clásicas: necesidad de CO₂, sensibilidad a los colorantes, aglutinación con sueros monoespecíficos, producción de SH₂, prueba de la ureasa, requerimiento de suero, prueba de oxidación metabólica. La sensibilidad a los fagos se usa para confirmar la identificación del género e identificación de especies. (Ver tabla)

Pruebas serológicas

1-Prueba de aglutinación rápida en placa (Huddleson)

Es comparable a la prueba lenta en tubo, pero un poco más sensible y menos específica, se presentan con más frecuencia aglutinaciones inespecíficas. Es rápida sencilla y la hemólisis de los sueros ejerce una influencia menor que en la prueba estándar en tubo.

Elementos necesarios:

- Antígeno: concentración celular de 10-12%, estandarizado.
- Caja de lectura o portaobjetos.
- Pipetas de 0,2 ml en graduaciones de 0,01 ml.
- Gotero de antígeno: debe calibrarse de tal manera que distribuya exactamente 0,03 ml por gota.
- Palillos o un mezclador: para mezclar el suero con el antígeno.

Técnica:

Con una pipeta sostenida en posición oblicua a 45° con respecto a la horizontal y tocando la placa de vidrio, se colocan 0,08; 0,04; 0,02; 0,01 ml de suero en cuatro casilleros de la misma hilera de la placa. Con el gotero sostenido en posición vertical se deja caer una gota de antígeno (0,03 ml) en cada cuadrado con suero.

Empezando por el cuadrado con 0,01 ml de suero, se mezclan bien el suero y el antígeno, abarcando las siguientes áreas:

- 1/25: 27 mm de diámetro
- 1/50: 24 mm de diámetro
- 1/100: 21 mm de diámetro
- 1/200: 18 mm de diámetro

La placa de vidrio se retira de la caja y se mueve suavemente en forma rotativa.

Lectura:

Se efectúa a los 8 min. Tres minutos antes de la lectura, se debe sacar la placa para darle un movimiento suave de rotación. Las lecturas se interpretan de la misma manera que para el método de la prueba en tubo.

2-Prueba de aglutinación lenta en tubo (Wright)

Es útil para diagnosticar brucelosis tanto en la fase aguda como crónica, sin embargo, en la etapa crónica, desaparecidas las IgM que son las que tienen avidéz por los antígenos aglutinantes, puede dar negativa.

Elementos necesarios:

- Antígeno estandarizado, conteniendo una suspensión de brucelas al 4,5%.
Antígeno: es una suspensión de *B. abortus* cuya concentración celular es ajustada de acuerdo a patrones y normalizada frente al patrón internacional de suero anti *B. abortus* (PISab).

- Calibrando ese antígeno las lecturas de los resultados se expresan en unidades internacionales por ml (UI/ml).
- Solución fisiológica fenolada (CINa 0,85% + 0,5% de fenol).
- Tubos de hemólisis. Gradillas.
- Pipetas de 0,2 ml en graduaciones de 0,01ml.
- Pipetas de 10 ml.
- Baño termostático o estufa a 37°C.

Técnica: en la prueba se usa antígeno al 0,045% en solución salina fenolada. Hacer esta dilución 12 h antes de su uso.

Tubos N°	1	2	3	4	5(testigo)
Suero problema (ml)	0,08	0,04	0,02	0,01	-
Antígeno (ml)	2	2	2	2	2

Agitar levemente. Incubar a 37°C 40-48 h

Título UI/ml	25	50	100	200	-
--------------	----	----	-----	-----	---

Lectura: el grado de aglutinación en cada una de las distintas diluciones puede clasificarse como completo (+), incompleto (i) o negativo (-).

- **Aglutinación completa:** es aquella en que el líquido sobrenadante de la mezcla suero-antígeno aparece claro y la agitación suave no rompe los grumos.
- **Aglutinación incompleta:** es la que muestra la mezcla suero-antígeno parcialmente clara y una suave agitación no rompe los grumos.
- **Aglutinación negativa:** es aquella en que la mezcla suero-antígeno aparece turbia y una suave agitación no revela grumos.

El título de la aglutinación está dado por la dilución del último tubo que presenta una clarificación evidente.

Fenómeno de zona: (prozona, fenómeno paradójal)

El fenómeno consiste en que un suero no aglutina en las diluciones más bajas, mientras que en las diluciones más altas ocurre una aglutinación intensa. En las mezclas suero-antígeno que contienen las más altas concentraciones de anticuerpos no ocurre la aglutinación, si bien hay unión de antígeno y anticuerpo. Este fenómeno se explica por la presencia de anticuerpos incompletos, univalentes que, aunque se unen al antígeno, no producen la segunda fase de la reacción, es decir la agregación. Estos anticuerpos pertenecen generalmente a la clase IgG. La presencia de estos anticuerpos se puede demostrar mediante la prueba de antiglobulina de Coombs.

3-Prueba del 2-mercaptoetanol (2-ME)

Bases metodológicas: La prueba se basa en la propiedad de los compuestos químicos con grupos sulfhidrilos, como el 2-mercaptoetanol, de inactivar las IgM. Se realiza simultáneamente con la prueba de aglutinación en tubo. La diferencia de título obtenida entre ambas pruebas corresponde a los anticuerpos IgM. Es selectiva, detecta solamente la presencia de IgG y es recomendada para descubrir portadores crónicos.

Elementos necesarios:

- Antígeno. Se utiliza el antígeno de la prueba de aglutinación en tubo diluido al 2% en solución salina.
- Solución de 2-ME 0,1 M. Se prepara agregando 7,80 ml de 2-ME a 992,20 ml de solución de cloruro de sodio al 0,85%.
- Tubos de hemólisis. Gradillas.
- Pipetas de 0,2 ml en graduaciones de 0,01 ml.
- Pipetas de 5 y 10 ml.
- Estufa para incubar a 37°C.

Técnica:

Tubos N°	1	2	3	4	5(testigo)
Suero problema (ml)	0,08	0,04	0,02	0,01	-
2-ME (ml)	1	1	1	1	1

Agitar levemente. Dejar en contacto durante 15 min a temperatura ambiente.

Antígeno (ml)	1	1	1	1	1
---------------	---	---	---	---	---

Incubar durante 48 h a 37°C

Título UI/ml	25	50	100	200	-
--------------	----	----	-----	-----	---

Lectura: La prueba se lee de igual manera que la prueba de aglutinación en tubo,

Interpretación: los resultados negativos en la prueba del 2-ME no son concluyentes porque en el período inicial de la enfermedad la mayoría de los anticuerpos presentes son del grupo IgM. Además, algunas personas enfermas de brucelosis nunca desarrollan una cantidad de IgG suficientes para que sea detectable por esta prueba.

4-Prueba de rosa de bengala (o prueba de la tarjeta)

La prueba se basa en la inhibición de algunas aglutininas inespecíficas a pH bajo; el pH ácido de la mezcla Ag-suero o plasma inhibe la aglutinación del antígeno por las

IgM. Se emplea un antígeno corpuscular con una concentración celular del 8% a pH 3,6.

Elementos necesarios:

- Antígeno rosa de Bengala
- Caja de lectura o portaobjetos y pipetas de la prueba de aglutinación en placa.

Técnica:

Colocar una gota de suero problema (0,03 ml) y una gota de antígeno (0,03 ml); mezclar con un palillo, ocupando un diámetro de 23-24 mm. El resultado de la prueba se lee a los 4 min. Las reacciones positivas presentan grumos de aglutinación, que pueden ser grandes o pequeños.

Interpretación:

La prueba es cualitativa, por lo que el resultado se informa como positivo: cualquier grado de aglutinación; o negativa: ausencia de aglutinación.

5-Prueba de difusión en gel de agar

Se usa para el diagnóstico de brucelosis causada por *B. ovis* y *B. canis*. Su ejecución es práctica y sencilla, brinda resultados similares a los obtenidos con la fijación de complemento.

Elementos necesarios:

- Tubos de 15x150 mm
- Láminas de vidrio de 75 x 50 mm
- Pipetas de 10 ml
- Pipetas Pasteur
- Cajas de Petri
- Perforador de agar
- Agar blando al 1%
- Antígeno soluble para prueba de precipitación

Técnicas:

El tubo que contiene 9 ml de agar blando al 1% se calienta en Baño María (100°C) hasta que el agar se haya fundido.

Con una pipeta se distribuyen 3 ml de agar blando fundido. El agar no debe salir de la lámina. Se deja secar a temperatura ambiente.

Las láminas se colocan en una caja de Petri y se llevan a 4°C durante 30 min.

Con un perforador de agar especialmente diseñado, se perforan simultáneamente 10

hoyos para los sueros y una ranura central para el antígeno.

Posteriormente se añaden 10µl de suero; colocar siempre un control positivo, no debe quedar ningún hoyo vacío.

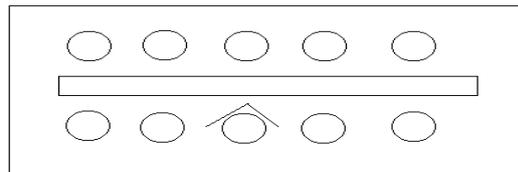
En la ranura central se coloca el antígeno, aproximadamente 0,5 ml, debe quedar lleno pero sin desbordar.

Se incuba posteriormente a temperatura ambiente (20-25 °C). Las lecturas se realizan a las 24, 48 y 72 h bajo un haz suave de luz indirecta y sobre fondo oscuro.

Interpretación:

Positivos: presentan bandas típicas de precipitación.

Negativos: ausencia de bandas.



6-Prueba de fijación del complemento

Es sensible y específica tanto para la forma aguda como crónica de la enfermedad. Se lleva a cabo en dos etapas: en primer lugar, el antígeno y el suero problema, (inactivado a 56°C), se incuban en presencia de suero normal de cobayo, el que suministra una concentración determinada de complemento. En la segunda etapa se mide la cantidad de complemento libre añadiendo el sistema indicador, formado por hematíes de oveja-suero antihematíes de oveja. Si existe lisis de estos eritrocitos el resultado de la prueba es negativo, pues significa que el complemento no fue fijado. Si no hay lisis, es positivo.

Esta prueba es excelente para el diagnóstico de brucelosis humana y animal, pero se debe tener en cuenta que, de ser ejecutada, todos los reactivos utilizados deben estar estandarizados.

7-Prueba de la antiglobulina o de Coombs

La prueba de Coombs es de valor como prueba complementaria en el diagnóstico de brucelosis. Fue diseñada para detectar anticuerpos monovalentes o incompletos (principalmente IgG e IgA) que reaccionan con el antígeno homólogo sin producir aglutinación.

La prueba consta de dos fases: en la primera, los anticuerpos incompletos específicos se unen al antígeno formando el complejo primario, pero la reacción no es observable. En la segunda fase, los anticuerpos específicos unidos a las células se comportan como un antígeno en la reacción con el suero antiglobulina específico de la

especie, dando una aglutinación macroscópica. El suero que no reacciona en esta segunda fase se considera libre de anticuerpos incompletos. La antiglobulina debe ser específica para la especie a la que pertenece el suero problema.

Elementos Necesarios:

- Antígeno: para aglutinación lenta en tubo.
- Suero antiglobulina, preparado generalmente en conejo, contra la especie que quiere estudiar.
- Pipetas de 1 a 2 ml.
- Tubos de ensayo 13 x 100.
- Centrífuga.

Técnica

En una serie de 5 tubos, colocar solución fisiológica (SF) a razón de 0,8 ml en el 1^{er} tubo y 0,5 ml en cada uno de los restantes. En el primer tubo agregar 0,2 ml de suero problema y calentar la mezcla a 70°C durante 10 min.

Transferir 0,5 ml de la mezcla del tubo 1 al tubo 2, mezclar. Transferir 0,5 ml al tubo 3 y así sucesivamente, descartando los últimos 0,5 ml.

Agregar 0,5 ml de antígeno aglutinante e incubar durante 2 h.

Añadir 1,5 ml de solución fisiológica y mezclar.

Centrifugar a 3000 rpm durante 29 min o más.

Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en una gota de SF. Luego agregar otros 2 ml de SF.

Repetir estos dos últimos pasos (lavado), dos veces; son indispensables para eliminar toda traza de suero.

Después de la centrifugación final, resuspender el sedimento en una gota de SF y luego agregar 1 ml de antiglobulina humana.

Incubar a 37°C durante 17 a 20 h. Leer los resultados como una prueba normal de aglutinación en tubo.

INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS SEROLÓGICAS

Cuando se utilizan los métodos serológicos de diagnóstico se debe tener en consideración la reactividad cruzada y el tipo de anticuerpo que predomina en cada etapa. En la aguda, se generan anticuerpos aglutinantes. La secuencia de producción de los distintos isotipos de inmunoglobulinas depende de la especie del hospedador. La IgM

e IgA irán descendiendo progresivamente hasta negativizarse antes de los 6 meses, mientras que la IgG podrá permanecer detectable durante 2 ó 3 años. Estos anticuerpos completos o aglutinantes son capaces de reaccionar con antígenos de la superficie bacteriana y pueden detectarse mediante reacciones de aglutinación en placa, lenta en tubo y fijación de complemento. Los títulos de las reacciones de aglutinación son elevados desde las primeras semanas de la infección. La prueba de aglutinación con 2-ME se correlaciona con la evolución clínica de la infección. En el comienzo de la misma, la diferencia entre los títulos de aglutinación con y sin 2-ME puede ser importante debido a la presencia mayoritaria de anticuerpos IgM que se inactivan con 2-ME.

Los anticuerpos de clase IgG permiten seguir el curso de la infección. No obstante, a medida que ésta se torna crónica comienzan a incrementarse, en forma progresiva, los anticuerpos de la clase IgG incompletos o no aglutinantes, que no son capaces de dar positivas las reacciones de aglutinación directa ni activar adecuadamente el sistema complemento. Cuando la concentración de anticuerpos no aglutinantes en el suero investigado alcanza valores relativos importantes, estas reacciones pueden arrojar resultados de bajo título y aún negativos.

Para lograr un diagnóstico inicial correcto se recomienda efectuar pruebas que evidencien la presencia de anticuerpos totales, tanto completos como incompletos. La prueba de Coombs puede ser reemplazada por los métodos de (inmunofluorescencia indirecta) y ELISA que cumplen con este requisito y permiten discriminar además los isotipos de inmunoglobulinas involucrados.

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DEL GÉNERO BRUCELLA

Especie	Bio-tipo	Necesidad de CO ₂	Prod. de H ₂ S	Actividad ureásica	Cultivos con colorantes ^a					Aglutinación con sueros ^b		
					Tionina			Fucsina básica		A	M	R
					a	b	c	B	c			
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	variable	-	+	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	variable	-	+	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	variable	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+(-) ^d	+	1-2 h	-	-	-	+	+	+	-	-
	2	+	+	1-2 h	-	-	-	-	-	+	-	-
	3	+(-)	+	1-2 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	+(-)	+	1-2 h	-	-	-	+	+	-	+	-
	5	-	-	1-2 h	-	+	+	+	+	-	+	-
	6	-	- o +	1-2 h	-	+	+	+	+	+	-	-
	7	-	- o +	1-2 h	-	+	+	+	+	+	+	-
	8	+	-	1-2 h	-	+	+	+	+	-	+	-
	9	- o +	+	1-2 h	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	++	0-30 min	+	+	-	-	-	+	-	-
	2	-	-	0-30 min	-	+	-	-	-	+	-	-
	3	-	-	0-30 min	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	0-30 min	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	0-30 min	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>	1 ^f	+	-	negativo	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>B. canis</i>	1	-	-	0-30 min	+	+	+	-	+/-	-	-	+

a La diferenciación de las especies se hace en agar-tripticasa-soja o en agar-triptosa con la siguiente gama de diluciones del colorante: a) 1:25000; b) 1:50000; c) 1:100000. Las pruebas con cepas que requieren CO₂ deben hacerse en una atmósfera enriquecida con ese gas; las demás se realizan en atmósfera normal. b A= suero monoespecífico abortus; M= suero monoespecífico melitensis; R= suero antibrucelas rugosas. c Tb= T bilis; DPO= dilución para pruebas ordinarias. d + (-)= Prueba generalmente positiva, pero pueden encontrarse variedades negativas, por ejemplo, la cepa 19. Para el cultivo de *B. abortus* biotipo 2 y *B. ovis* es preciso añadir 5% de suero al medio base.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

Observar e interpretar las siguientes pruebas serológicas:

- Prueba de aglutinación rápida en placa (Huddleson)
- Prueba de aglutinación lenta en tubo (Wright)
- Prueba del 2-mercaptoetanol (2-ME)

BIBLIOGRAFÍA

- Vassalos, C., *et al.* 2009. Brucellosis in humans: why is it so elusive? Reviews in Medical Microbiology 2009. 20: 63-73.
- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Capítulo 37. *Brucella y Francisella*. Edit. Elsevier España,S.A. 5º edic. 2006.

TRABAJO PRÁCTICO DE LABORATORIO Nº11

INTOXICACIÓN ALIMENTARIA

OBJETIVOS

- Incorporar el concepto de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs).
- Adquirir conocimiento sobre: toma y procesamiento de muestras provenientes de intoxicaciones alimentarias.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)

Se define a las enfermedades transmitidas por alimentos al conjunto de signos visibles y síntomas referidos a lo que el paciente siente y/o relata, originados por la ingesta de productos alimenticios o ingredientes, bebida o agua que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas.

Los alimentos que el ser humano ingiere a diario deben ser aptos para el consumo, es decir estar libres de gérmenes patógenos y sustancias tóxicas y con una carga microbiana inicial no patógena que no implique riesgo de alteración para el alimento ni riesgo de enfermar, para el consumidor.

CÓMO SE ORIGINAN LAS ETAs?

Después de que los alimentos salen de la fábrica o industria donde han sido procesados o tratados tecnológicamente, son almacenados y manipulados durante el transporte en los almacenes al por mayor y al por menor, en las cocinas de instituciones donde se preparan comidas para colectividades, en los establecimientos comerciales donde se sirven comidas, en las máquinas automáticas donde éstas se venden y, finalmente, en los propios hogares. El almacenamiento o la manipulación incorrecta de los alimentos en los lugares mencionados, puede ser causa de la alteración de estos productos y/o la aparición de brotes alimentarios.

BROTE ALIMENTARIO: se origina cuando 2 o más personas manifiestan la misma enfermedad, presentan los mismos síntomas, excretan los mismos patógenos, observándose una asociación epidemiológica de tiempo, persona y lugar.

La enfermedad originada puede ser una intoxicación, una toxoinfección o una infección.

INTOXICACIÓN: producida por la ingesta de alimentos contaminados con toxinas formadas en tejidos de plantas o animales o de productos metabólicos excretados por

microorganismos en los alimentos o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo. Ej. Consumo de enlatados con toxina botulínica, ingesta de polenta con micotoxinas, presencia de arsénico o plomo en el agua, exceso de nitratos en chasinados.

TOXOINFECCIÓN: producida por la ingesta de alimentos con microorganismos o esporas de los mismos que si bien no proliferan en el organismo liberan un agente tóxico (toxina). Ej. Consumo de platos cárnicos con *Clostridium perfringens*, ingesta de miel contaminada con *Clostridium botulinum* en bebés menores del año (botulismo del lactante), consumo de platos a base de arroz contaminado con *Bacillus cereus* (fase diarreica).

INFECCIÓN: se produce por la ingesta de alimentos contaminados con agentes infecciosos como bacterias, virus, protozoarios o helmintos que en la luz intestinal pueden multiplicarse e invadir tejidos u órganos. Ej. Consumo de productos a base de huevos con *Salmonella* spp, consumo de agua contaminada con *Shigella* spp.

QUÉ FACTORES CONTRIBUYEN A LA APARICIÓN DE LAS ETAs?

- Personas infectadas o portadoras con mala higiene personal.
- Equipamiento sucio.
- Ingredientes crudos contaminados.
- Contaminación cruzada.
- Cocción o recalentamiento inadecuado.
- Refrigeración o temperatura de mantenimiento inadecuada.
- Alimentos preparados mucho antes de ser servidos.

CUÁLES SON LOS PRINCIPALES AGENTES ETIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LAS ETAs?

Agentes bacterianos: *Staphylococcus aureus*, coliformes, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Yersinia enterocolítica*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*.

Hongos: el género *Aspergillus* presente en el maní, produce aflatoxinas hepatocancerosas.

Zoonosis alimentarias

Zoonosis bacterianas: las principales zoonosis bacterianas son la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* o *M. Hominis*, *M. bovis*, *ovis* o *avium*) y la brucelosis (*B. melitensis*, *abortus*, *bovis*, *ovis*) que constituyen verdaderas endemias, sobre todo en

zonas serranas, donde prospera una tradicional industria casera de la leche y derivados, producida en un ambiente familiar y folclórico, exento de todo contralor higiénico-sanitario. También la costumbre de beber la leche "al pie de la vaca" sin hervirla proveniente de animales enfermos o subclínicos, puede enfermar de Fiebre Aftosa.

Zoonosis parasitarias: en general, los parásitos, tienen una distribución cosmopolita y resulta difícil o imposible su total control o erradicación, así como también el control de vectores y hospedadores intermediarios contaminando productos cárnicos, pescados y moluscos, vegetales, etc. El grave problema es la ingestión de estos alimentos crudos, mal lavados o insuficientemente cocidos; siendo las asociaciones epidemiológicas más frecuentes las siguientes:

berros-caracoles: *Fasciola hepática* y amebas.

Peces y carnes rojas: Triquinas, Tenias y Toxoplasma.

Lácteos y agua: Amebas, Giardias, Ascaris y Trichuris.

Para prevenir las ETAs se recomienda una correcta y completa sanidad de los rodeos, cumplir estrictas normas de higiene en la elaboración de productos y subproductos alimenticios y realizar un consumo de los mismos solamente de aquellas firmas serias que estén amparadas por un eficiente control bromatológico, para que el alimento llegue al consumidor libre de todo riesgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE ETAS

Ante un brote de intoxicación o toxoinfección alimentaria, el laboratorio de microbiología clínica deberá analizar alimentos que vehiculizan toxinas o microorganismos responsables del mismo. Según las características del brote las muestras pueden incluir además del alimento, sueros, heces, vómitos de pacientes, sangre trozos de bazo e hígado y contenido intestinal en casos fatales; muestras de personas que estuvieron en contacto con los alimentos implicados (portadores) etc.

Las muestras de alimentos sospechosos deben recogerse en el domicilio del paciente o en el domicilio donde fue ingerido o adquirido. Se eligen las porciones donde la multiplicación del microorganismo es más factible, teniendo en cuenta además el muestreo de cada componente del alimento.

Se toman asépticamente y guardan en envases esterilizados, considerando la descripción de la muestra con todas las características. Deberán analizarse lo más pronto posible o bien refrigerarse.

Los tipos de pruebas dependen de los signos y síntomas clínicos de las personas afectadas, período de incubación, tipo de alimento, coloración de Gram (se hace con una

gota del alimento líquido o del homogeneizado).

La confirmación de la participación de un alimento exige que el mismo agente o la misma toxina hallada en pacientes se encuentre en el alimento implicado. Si se dispone de muestras clínicas, se confirma si se detectan sustancias tóxicas o un número significativo de patógenos específicos o el hallazgo de patógenos entéricos (*Salmonella* o *Shigella*).

Los métodos utilizados para el aislamiento y recuento de gérmenes patógenos son poco eficaces cuando éstos se hallan en bajo número o cuando abundan otros microorganismos. También el tiempo y el costo suelen ser prohibitivos. Ante estas dificultades para la determinación de gérmenes patógenos en los alimentos, se utilizan grupos de gérmenes de enumeración más fácil y cuya presencia en cierto número es indicación o reflejo de que los alimentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran permitir el desarrollo de microorganismos patógenos; estos grupos de bacterias que se utilizan a tal fin se denominan "organismos marcadores" y son de gran utilidad tanto para determinar la calidad bacteriológica de los alimentos como la garantía que ofrecen al consumidor.

Cuando los microorganismos marcadores comparten la ecología con los patógenos hablamos de ÍNDICES Ej. Recuento de Coliformes. La presencia de *E. coli* en un alimento se interpreta como contaminación fecal, es índice de la presencia simultánea de patógenos entéricos como salmonelas, shigelas, parásitos, virus entéricos. Sin embargo, la presencia de *E. coli* en un alimento no indica necesariamente la existencia de patógenos, simplemente advierte el riesgo de que pudieran estar presentes.

Cuando los marcadores no comparten la ecología con los patógenos hablamos de INDICADORES, Ej. Recuento de gérmenes aerobios mesófilos, es indicador de materias primas contaminadas, limpieza y desinfección incorrecta, exposición a tiempos y temperaturas inadecuadas durante el procesamiento, conservación o transporte de los alimentos indicando una rápida alteración del producto. También indica que han existido condiciones favorables para el desarrollo de gérmenes patógenos, ya que la mayoría de las especies patógenas son mesófilas.

El recuento de la flora aerobia mesófila viable tiene valor limitado en alimentos fermentados o madurados como, quesos, salchichas, lácteos, tampoco refleja la conservabilidad de alimentos refrigerados, donde debe realizarse contaje de gérmenes psicrófilos.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SALMONELAS

Muestras de alimentos: mayonesa de ave, huevos en polvo, empanada de pollo.

Muestras clínicas: heces.

Tomar 25 g del alimento y diluir con 225 ml de caldo lactosado (según el tipo de alimento se pueden utilizar otros diluyentes). Ajustar el pH a 6,8-7,2 e incubar a 35°C durante 24 h.

Los métodos para el aislamiento e identificación de salmonelas se basan en:

- enriquecimiento en medio no selectivo (caldo lactosado)
- enriquecimiento en medio selectivo (caldo selenito, caldo tetrionato)
- siembra en medio selectivo (agar verde brillante, agar S-S o agar Bismuto-sulfito)
- identificación taxonómica de las colonias sospechosas.

(Ver Trabajo Práctico de coprocultivo).

Además de las salmonelas, otras enterobacterias como *Enterobacter*, *Proteus*, *E. coli* están presentes en mayor número y son más resistentes que las salmonelas, a los procesos de calor, congelación o desecación, por lo que desarrollan más rápidamente inhibiendo a *Salmonella*. El enriquecimiento selectivo tiene la finalidad de inhibir el desarrollo de los gérmenes competidores y no a salmonela.

El enriquecimiento no selectivo tiene como fin permitir la recuperación rápida de las salmonelas que se encuentran en algunos alimentos en un estado de inactividad fisiológica o trauma (injuria metabólica o daño subletal), por sometimiento del alimento a desecación, congelación, etc. Esta injuria metabólica se determina por la incapacidad de crecer en medios selectivos.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SHIGELAS

Muestras clínicas: heces.

Muestras de alimentos: agua.

Colocar 25 g de muestra en un recipiente estéril, agregar 225 ml de caldo selenito e incubar a 35°C durante 10-12 h. Transferir con un ansa a medios selectivos e identificar las colonias sospechosas.

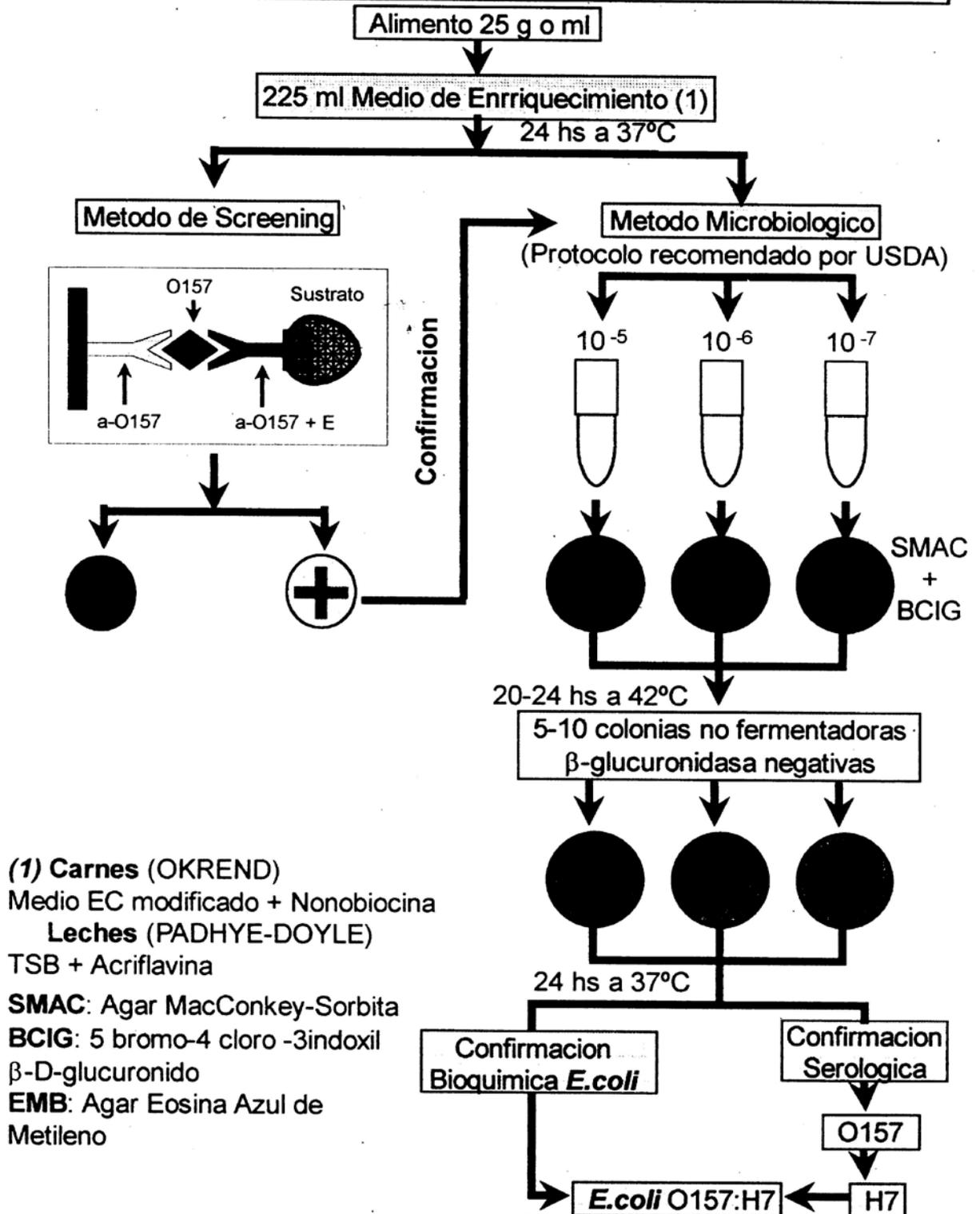
(Ver Trabajo Práctico de coprocultivo).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *E. coli* ENTEROVIRULENTAS

Muestras clínicas: heces (Ver Trabajo Práctico de coprocultivo)

Muestras de alimentos: agua, alimentos crudos o mal cocinados.

Detección de *E. coli* O157:H7 en Alimentos



(1) **Carnes (OKREND)**
Medio EC modificado + Nonbiocina

Leches (PADHYE-DOYLE)
TSB + Acriflavina

SMAC: Agar MacConkey-Sorbita

BCIG: 5 bromo-4 cloro -3indoxil
β-D-glucuronido

EMB: Agar Eosina Azul de Metileno

Extraído de: Manual de Procedimientos: Detección de *E. coli* productor de toxina Shiga O157 y no O157 en alimentos por separación inmunomagnética y PCR. Servicio Fisiopatogenia. ANLIS. Dr. Carlos G. Malbrán, 2006

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

Muestras de alimentos: Leche, quesos, productos lácteos, carnes frescas, jamón, salchichas, salame, pescados, mariscos y hortalizas.

El análisis de los brotes de listeriosis producidos en países industrializados de América del Norte, Europa y Oceanía a partir de 1975, han puesto en evidencia la transmisión alimentaria de esta infección. *Listeria monocytogenes*, es un patógeno oportunista que se manifiesta principalmente como meningitis y septicemia en ancianos y pacientes inmunodeprimidos, abortos o el nacimiento de niños infectados y menos frecuentemente gastroenteritis febril en individuos sanos.

Las características de las listerias, bacterias ubicuas, muy resistentes a diversas condiciones ambientales como pH ácido y elevadas concentraciones de NaCl. microaerobias y psicrotróficas, permiten explicar su presencia, persistencia y crecimiento en diversos alimentos simples o procesados. Leche, quesos, productos lácteos, carnes frescas, productos cárnicos, pescados, mariscos y hortalizas pueden estar contaminados. La leche se puede contaminar a partir de diferentes fuentes ambientales incluyendo el suelo, abono bovino o menos frecuentemente por mastitis. Un número sustancial de listerias sobreviven a la elaboración y maduración de las variedades, brie, cheddar, roquefort, feta, cottage y camembert. *L. monocytogenes* puede sobrevivir en diversos tipos de carne durante el almacenamiento a 4°C y 25°C incluyendo carne vacuna, porcina, de aves, jamón, salchichas y salame. Diferentes factores internos (composición, pH y actividad acuosa) o externos (temperatura, atmósfera gaseosa, flora competitiva) influyen en el desarrollo del microorganismo en carnes procesadas. Se detectan mayores concentraciones en productos listos para ingerir. Esta bacteria también está presente en la mayoría de las muestras de vegetales en bajas concentraciones, resultando difícil su aislamiento. Se ha detectado en ensaladas listas para consumir que incluyen repollo, apio, zanahoria, lechuga, pepinos, puerro, cebolla, berros e hinojo. En los últimos años se manifiesta un cambio en los hábitos alimentarios de la población mundial. Sin embargo, mientras la ecología de *L. monocytogenes* no esté totalmente esclarecida, los consumidores que tratan de beneficiarse con dietas que contribuyen a su bienestar estarán también ingiriendo alimentos que contienen listerias.

Etapas metodológicas

- 1.- Enriquecimiento
- 2.- Aislamiento en medios selectivos
- 3.- Identificación bioquímica

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO

(Composición en g/l)

FDA: peptona de caseína 17; peptona de harina de soja 3; dextrosa 2; NaCl 5; K₂HPO₄ 2,5; extracto de levadura 6; clorhidrato de acriflavina 0,015; ácido nalidíxico 0,04; solución acuosa etnólica de cicloheximida (40%) 0,05; pH 7,3.

DONNELLY Y BAIGENT (EDBI): proteosa- peptona 5; NaCl 20; K₂HPO₄ 1,35; esculina 1; ácido nalidíxico 0,04; clorhidrato de acriflavina 0,012; pH 7,2.

EDB II: caldo EDBI adicionado de 0,025 g/l de clorhidrato de acriflavina en 10 ml de agua estéril; pH 7,2.

UNIVERSITY OF VERMONT (UVM I): triptosa 10; extracto de carne 5; extracto de levadura 5; NaCl 20; K₂HPO₄ 1,35; esculina 1; ácido nalidíxico 0,02; clorhidrato de acriflavina 0,012; pH 7,2.

UVMIII: caldo UVM I adicionado de 0,025g/l de clorhidrato de acriflavina en 10 ml de agua peptonada estéril; pH:7,2.

MEDIOS DE AISLAMIENTO

(Composición en g/l)

AGAR PALCAM: peptona 23; almidón 1; NaCl 5; agar- agar 13; D-manitol 10; citrato férrico amónico 0,5; esculina 0,8; glucosa 0,5; LiCl 1,5; rojo fenol 0,8. El medio se esteriliza a 121°C durante 15 minutos y luego se incorpora el contenido de un vial (composición en mg/vial: polimixina B 5; ceftazidima 10; acriflavina 2,5) liofilizado y reconstituido con 2 ml de agua destilada estéril; pH 7± 0,1.

AGAR OXFORD: peptona 23; almidón 1; Na Cl 5; agar-agar 13; citrato amónico 0,5; esculina 0,8; LiCl 15.(Suplemento: acriflavina; cicloheximida; sulfato de colistina; fosfomicina) pH 7 ± 0,2.

IDENTIFICACIÓN de *Listeria monocytogenes*

- Colonias: gris-verdoso o negras con depresión central en los medios Oxford o Palcam
- Catalasa + / oxidasa -
- Colonias azuladas en TSA
- Bacilos no esporulados, Móviles, Gram +
- Xilosa -
- Hemólisis + / CAMP test +

Pruebas complementarias

SH ₂ –	Glucosa +	RM +
VP +	Indol –	Citrato –
Ureasa –	Manitol –	Ramnosa +
Nitrato +		

Métodos rápidos

- Componentes específicos de la pared celular
- Secuencias específicas ADN/ARN
- Productos específicos del microorganismo (enzimas, etc)

 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *S. aureus*

Muestras de alimentos: productos de pastelería, cremas, helados.

Muestras clínicas: heces, hisopado rectal, vómitos, hisopado nasal de portadores.

Homogeneizado de la muestra:

Si es líquida se mezcla bien y se coloca una porción en el recipiente que se utilizará en la incubación, si es sólida se licua previamente y luego se transfiere al recipiente. Se aconseja pesar 25 g y mezclar con 225 ml de diluyente (peptona 1 g, NaCl 0,5 g AD 100 ml, pH 7) dilución 1:10.

A- Si se supone que el alimento contiene más de 100 bact/g se efectúa el aislamiento y recuento en la siguiente forma: preparar diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴; por cada dilución sembrar 1 ml distribuido en tres placas conteniendo medio de Baird-Parker, 0,4 ml en la primera y 0,3 ml en cada una de las restantes.

Distribuir con espátula de Drigalsky e incubar a 35°C, 48 h.

Seleccionar las placas que contienen entre 20 a 200 colonias sospechosas, elegir algunas de ellas y hacer prueba de coagulasa.

Multiplicar el número de colonias semejantes a las que dieron coagulasa positiva por el factor de dilución.

Pruebas complementarias:

- Catalasa
- Termonucleasa
- Utilización anaeróbica de glucosa y manitol: técnica de Hugh y Leifson *S. aureus* da estas pruebas positivas (excepcionalmente algunas cepas pueden ser TNasa (-).

B- Alimentos con *S. aureus* < 100/g, se utiliza el método del número más probable. (NMP).

A partir de cada dilución (preparada como en A) se procede según el esquema:



Incubar 48 h a 35°C

Tubos que presentan turbidez



una ansada

Medio Baird Parker

colonias sospechosas



De los tubos confirmados como positivo determinar el NMP según Tabla. Valor admitido por el CAA hasta 100 estafilococos coagulasa +/g.

Nota: la mayoría de las pruebas de *S. aureus* coagulasa positiva (+ o 4+) y TNasa positiva son enterotoxigénicas. La determinación de las enterotoxinas A, B, C, D, E se realiza por el método de sensibilidad óptima en placas.

Medios de cultivo***Tripticasa soja agar (TSA)***

Tripticasa	15 g
Peptona de soja	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15g
Agua destilada	1000 ml

pH final: 7,3

Añadir los ingredientes al agua: Calentar para disolver con agitación frecuente y hervir durante 1'. Repartir en tubos o botellas. Esterilizar 15' a 121 °C.

Agar azul de toluidina- DNA (TDA)

DNA	0,3 g
Agar	10 g
Cloruro de sodio anhidro	0,11 g
Cloruro de sodio	10 g
Azul de o-toluidina	0,083 g
Tris	6,1 g

Disolver el Tris en 1 litro de agua destilada y llevar el pH a 9,0. Añadir los restantes ingredientes, excepto el azul de o-toluidina y hervir para obtener completa disolución del DNA y el agar. Disolver el azul de o-toluidina en esta solución y distribuir en pequeñas porciones en frascos o tubos con tapón de goma. No es necesario esterilizar.

El medio es estable a temperatura ambiente por aproximadamente 4 meses y puede usarse aún luego de repetidos ciclos de fundido.

Baird-Parker

Medio Base:	Triptona	10 g
	Extracto de carne	5 g
	Extracto de levadura	1 g
	Piruvato de sodio	10 g
	Glicina	12 g
	Cloruro de litio	5 g
	Agar	20 g
	Agua destilada	1000 ml

pH 7+/-0.2 a 25 °C.

Esterilizar en autoclave 15' a 121°C. En el momento de usar agregar: 5 ml de emulsión de yema de huevo al 20%(1/5) en SF y 0.3 ml de una solución de telurito de potasio al 3.5% en agua destilada, por cada 100 ml de medio base.

Pruebas de Identificación

Catalasa

Sembrar colonias sospechosas por estrías en tubos con tripticase soy agar (TSA). Incubar 24 h. a 35°C, tomar una ansada y depositar sobre una gota de agua oxigenada al 3% colocada previamente sobre un portaobjetos. Observar inmediatamente abundantes burbujas.

Termonucleasa

- Sembrar una placa del medio de Baird-Parker
- Incubar a 35-37°C, 16-18 h
- Colocar la placa en estufa a 60°C, 2 h
- Cubrir con agar azul o-toluidina-DNA (TDA)
- Incubar la placa a 35-37°C durante 3 h
- Observar colonias rodeadas de un halo rosado bien definido indicando termonucleasa positiva (+).

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un organismo Gram positivo, aerobio o anaerobio facultativo, esporulado, que se encuentra en el suelo, vegetales y en muchos alimentos brutos o manufacturados.

La intoxicación por alimentos con *B. cereus* es una enfermedad con dos manifestaciones clínicas definidas: un tipo emético y un tipo diarreico, este último comúnmente asociado con ingestión de carnes, salsas, etc., mientras que la primera ha sido descrita casi exclusivamente en asociación con el consumo de arroz. El período de incubación del tipo emético varía de 1 a 6 h, mientras que la forma diarreica es de 6 a 24 h.

El aislamiento de *B. cereus* de las heces de un paciente no es suficiente para un diagnóstico porque el microorganismo puede estar presente en deposiciones normales. Se considera importante la cantidad de *B. cereus* en el alimento para reconocer su valor real o potencial en una intoxicación alimentaria. Se requiere aproximadamente entre 10^5 y 10^7 o más microorganismos viables por gramo de alimento para producir intoxicación.

El principal factor que determina casos de intoxicación alimentaria es la mala refrigeración de alimentos proteicos con alto contenido de humedad que permiten la

proliferación de este microorganismo y la producción de enterotoxinas que serían las responsables del cuadro clínico.

Recuento presuntivo de *Bacillus cereus*:

Comenzar el trabajo tan pronto como sea posible después de tomar la muestra, en caso contrario, refrigerar ésta a 0-5°C. Si las muestras ya están congeladas, descongelarlas en su envase original y procesarlas cuanto antes.

Pesar en el vaso tarado del homogeneizador 25 g representativos de la muestra total y añadir diluyente (agua peptonada al 1 %) en cantidad suficiente para obtener la dilución 10^{-1} (aproximadamente 225 ml).

Homogeneizar a 8000 r.p.m. durante unos segundos. Dejar en reposo la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente para permitir la reactivación de los microorganismos.

Mezclar el contenido del recipiente por agitación y realizar diluciones en agua peptonada a partir de la dilución 10^{-1} hasta 10^{-7} .

Transferir por duplicado 0,1 ml de cada una de las diluciones sobre la superficie de placas conteniendo agar yema de huevo-polimixina-rojo fenol, previamente secadas, extender con espátula de vidrio e incubar en aerobiosis a 35°C durante 48 h.

Elegir las placas que contengan entre 20 y 200 colonias, contar las sospechosas y calcular el número presuntivo de *B. cereus* por gramo de alimento. Las colonias sospechosas aparecen rodeadas de un halo opaco de precipitación debido a la producción de lecitinasa, sobre un fondo rojo por su incapacidad de fermentar el manitol. El valor promedio obtenido del par de placas, se multiplica por 10 (se sembro 0,1 ml) y por la inversa de la dilución.

Confirmación de *B. cereus*

Para confirmar, elegir al azar un número de colonias típicas igual a la raíz cuadrada del número obtenido o su fracción entera menor, nunca menos de 3, en las placas donde se hizo el recuento.

Sembrar a partir de cada colonia un tubo con agar nutritivo inclinado, incubar a 35°C durante 24 h.

Efectuar la coloración de Gram de cada cultivo y verificar su pureza. De los tubos en que se observan bacilos cortos Gram positivos con extremos cortados en escuadra, en pequeñas o largas cadenas con o sin presencia de esporas, realizar las siguientes pruebas de identificación:

- Fermentación de carbohidratos: Glucosa, sacarosa, glicerol, salicina
- Reducción de nitratos
- Leche tornasolada
- Licuación de la gelatina
- Hidrólisis del almidón
- Producción de acetil metil carbinol

Bacillus cereus reduce los nitratos a nitritos, da ácido pero no gas de glucosa, sacarosa, glicerol y salicina. Produce una rápida peptonización sin coagulación o con una coagulación débil en leche tornasolada, licua la gelatina con rapidez, hidroliza el almidón y produce acetil metil carbinol.

De acuerdo al resultado de las pruebas bioquímicas de los cultivos provenientes de las colonias sospechosas se determina el número de *B.cereus* por gramo de alimento.

Ejemplo:

Si el par de placas seleccionadas fueron las correspondientes a la dilución 10^{-4} y el promedio de colonias sospechosas es 81, se pican 9 colonias a agar nutritivo para realizar las pruebas bioquímicas.

Si de esas 9 colonias estudiadas, 6 se confirman como *B. cereus*, se hace el siguiente cálculo:

Nº presuntivo de *B.cereus*:

$81 \times 10 \times 10.000 = 81 \times 10^5$ colonias presuntivas/g de alimento.

Nº de *B. cereus*:

9 colonias presuntivas..... 6 corresponden a *B.cereus*

81×10^5 colonias presuntivas..... 54×10^5 *B.cereus*/g de alim.

Pruebas bioquímicas:

Fermentación de carbohidratos:

Inocular una ansada de cultivo en cada uno de los siguientes caldos de fermentación: glucosa, sacarosa, salicina, glicerol. Incubar los tubos sembrados a 35°C durante 24 h.

Reducción de nitratos:

Inocular en caldo nitrato una ansada de cultivo e incubar los tubos a 35°C durante 18-24 h. Añadir a cada cultivo 0,5 a 1 ml de solución de ácido sulfanílico e igual cantidad de solución de alfa naftilamina. Agitar los tubos y observar el color que presenta. La aparición de color rosa o rojo, representa la reacción positiva de reducción de nitrato.

Leche tornasolada:

Inocular una ansada de cultivo en medio de leche tornasolada e incubar los tubos a 35°C durante 24 h.

Licuación de gelatina:

Inocular un medio de gelatina nutritiva con ansa recta por picadura e incubar los tubos a 30°C durante 24 h en posición vertical.

Hidrólisis del almidón:

Preparar las placas de agar almidón, secar su superficie y sembrar haciendo una estría con un ansa en sentido diametral. En la misma placa, pueden sembrarse 2 o 3 cultivos. Incubar a 35 °C durante 24 h. Cubrir la superficie de las placas con solución de Lugol. La aparición de una zona clara alrededor de las estrías, indica hidrólisis de almidón.

Producción de acetil metil carbinol:

Inocular un caldo glucosa tamponado con un ansa e incubar a 35 °C durante 48 h.

Comprobar la producción de acetil metil carbinol, colocando 1 ml de cultivo en un tubo, añadiendo al mismo 0,6 ml de una solución de alfa naftol y 0,2 ml de una solución de hidróxido de potasio al 40%. Agitar después de agregar cada reactivo. La adición de algunos cristales de creatina al medio a ensayar, acelera e intensifica la reacción. Hacer la prueba a temperatura ambiente y leer los resultados 4 horas después de la adición de los reactivos. La aparición de un color rosa constituye una prueba positiva.

Medios y reactivos:**Agar yema de huevo-polimixina-rojo fenol.**

Extracto de carne	1 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
D-manitol	10 g
Agar	15 g
Rojo fenol	0,025 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,2 ± 0,1

Añadir los componentes a 1 litro de agua destilada mezclar bien y calentar hasta ebullición para disolverlos completamente. Enfriar a 50-60°C y ajustar el pH a 7,2.

Repartir en volúmenes de 90 ml y esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C. Enfriar a 45°C, añadir 10 ml de emulsión de yema de huevo y 1 ml de solución acuosa de sulfato de polimixina B al 0,1 % esterilizada por filtración.

Suspensión yema de huevo:

Limpia y esteriliza la cáscara de los huevos con alcohol de 96 ° extraer asépticamente las yemas y colocarlas en una probeta estéril. Añadir igual volumen de solución salina estéril y mezclar bien.

Caldo carbohidrato rojo fenol

Peptona o tripticasa	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo fenol	0,025 g
Carbohidrato	5 g

Disolver los componentes, excepto el carbohidrato, en 900 ml de agua, ajustar la reacción de tal forma que el pH después de la esterilización sea de 7, distribuir en volúmenes de 4,5 ml en tubos de cultivo conteniendo tubitos de fermentación de Durham invertidos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Enfriar a temperatura ambiente y añadir a cada tubo 0,5 ml de una solución acuosa al 5% esterilizada por filtración del correspondiente carbohidrato.

Caldo nitrato:

Triptona o tripticasa	20 g
Fosfato disódico	1 g
Glucosa	1 g
Agar	1 g
Nitrato de potasio	1 g

Añadir los componentes a 1 litro de agua destilada estéril, calentar hasta ebullición agitando continuamente hasta disolución completa. Distribuir en tubos volúmenes de 5 ml y esterilizar a 121 °C durante 15 min. Si el medio se ha preparado hace más de 2 días conviene hervir durante 2 min. antes de usarlo.

Leche tornasolada:

Leche descremada en polvo	100 g
Tornasol	5 g

Mezclar los componentes con 1 litro de agua destilada y agitar en forma ininterrumpida vigorosamente. Ajustar el pH a 6,8. Filtrar a través de muselina o algodón, distribuir 10 ml por tubos, esterilizar en autoclave a 121°C 10 min.

Observación: cuando el medio está caliente pierde el color pero lo retoma cuando enfría.

Agar gelatina nutritiva:

Gelatina	30 g
Trypticase	10 g
Extracto de levadura	1 g
Taurocolato de sodio	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 8,5

Disolver los ingredientes y ajustar el pH. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

Agar almidón

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Almidón soluble	2 g
Agar	15 g

Añadir los componentes excepto el almidón a 1 litro de agua destilada y calentar hasta ebullición. En el momento de añadir el almidón, hacerlo poco a poco, agitando vigorosamente. Hervir durante 3-4 min.hasta disolución completa. Enfriar a 50-60°C y ajustar el pH a 7,2.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Caldo glucosa tamponada:

K ₂ HPO ₄	5 g
Peptona	5 g
Glucosa	5 g
A. D	1000 ml

pH: 7,2

Esterilizar la glucosa por separado. Autoclavar a 121°C 15 min.

A- Solución de ácido sulfanílico:

Acido sulfanílico	1 g
Acido acético 5 N (una parte de Ac. Acético glacial en 2,5 de agua)	125 ml

Disolver el ácido sulfanílico en el ácido acético (se disuelve lentamente)

B- Solución alfa naftilamina:

Alfa naftilamina	0,5 g
Acido acético 5N	100 ml

Disolver el alfa naftilamina en el ácido acético. Para la prueba de nitrato, mezclar partes iguales de las soluciones A y B.

Solución de alfa-naftol:

Alfa naftol (punto de fusión 92,5 °C superior)	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 ml.

Preparar la solución en el día. Disolver el alfa-naftol en el alcohol. En la reacción de Voges Proskauer, se añaden 0,6 ml de la solución alfa-naftol y 0,2 ml de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 40% a 1 ml de cultivo.

Agua peptonada para diluciones:

Disolver 1 g de peptona en 1 litro de agua destilada y ajustar el pH a $7 \pm 0,1$. Distribuir en frascos o en tubos. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens es un bacilo positivo, esporulado, anaerobio ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo su hábitat principal el suelo y contenido intestinal del hombre y animales. En el ser humano puede producir, entre otras enfermedades, gangrena gaseosa, infecciones uterinas, toxoinfección alimentaria, enteritis necrótica.

La toxoinfección alimentaria es adquirida mediante la ingestión de alimentos contaminados con *C. perfringens* tipo A, generalmente algún tipo de carne hervida o estofado guardado durante algún tiempo en frío y luego recalentado. Las esporas, que son resistentes al calor sobreviven la cocción y germinan durante el enfriamiento lento en anaerobiosis. Una vez ingerido el alimento los gérmenes esporulan en el intestino y allí se produce la ENTEROTOXINA durante el proceso de esporulación. Los síntomas de la intoxicación aparecen dentro de las 12 h y son náuseas, dolores abdominales y diarreas,

la recuperación es rápida.

Se requieren aproximadamente 10^5 microorganismos viables por gramo de alimento para producir intoxicación, por lo que es necesaria su cuantificación.

Recuento presuntivo de *C. perfringens*

Coloración de Gram a partir de la muestra.

Pesar asépticamente 25 g del alimento en un vaso de licuadora estéril y agregar agua peptonada al 1% hasta 250 ml (dil 1/10), homogeneizar durante unos segundos a 8.000 rpm aireando lo menos posible.

A partir de la dilución 10^{-1} hacer diluciones hasta 10^{-6} . Mezclar sin burbujear.

Transferir por duplicado 1 ml de cada dilución a placas de Petri estériles y agregar 15 ml de agar triptosa-sulfito-cicloserina (TSC) fundido y enfriado a 45-50 °C en cada placa. Mezclar con movimientos suaves de rotación para evitar oxigenación y dejar solidificar.

Incubar 24-48 h a 35°C anaeróticamente.

Elegir las placas que contengan entre 20 y 200 colonias y contar las negras, sospechosas de *C. perfringens*.

Calcular el número presuntivo de *C. perfringens* por gramo de alimento: al valor promedio obtenido del par de placas se lo multiplica por la inversa de la dilución correspondiente.

Nota: se elige el medio TSC por la elevada tolerancia a la cicloserina y la intensa propiedad reductora de la bacteria sobre el sulfito.

Confirmación de *C. perfringens*

Seleccionar un número de colonias cercano a la raíz cuadrada del total con un mínimo de 3; inocular cada colonia en un tubo con medio carne cocida (MCC) regenerado (15' en Baño María hirviente) y enfriado inmediatamente. Incubar a 33°C durante 18-24 h.

Efectuar la coloración de Gram a partir de cada cultivo. De los tubos en que se observan bacilos Gram positivos realizar las siguientes pruebas de identificación:

- Hidrólisis de la gelatina
- Hidrólisis del almidón
- Investigación de lecitinasa
- Producción de hemolisina
- Investigación de catalasa
- Movilidad y reducción de nitratos
- Leche hierro

C. perfringens licua la gelatina, hidroliza el almidón, es lecitinasa positivo, produce hemolisinas, es catalasa negativa, inmóvil, reduce los nitratos a nitritos ataca la leche produciendo coágulo tumultoso.

De acuerdo al resultado de las pruebas de identificación de los cultivos provenientes de las colonias sospechosas se determina el número de *C. perfringens* por gramo de alimento.

Ejemplo:

Si el par de placas seleccionadas corresponde a la dilución 10^5 y el promedio de colonias sospechosas es de 100 se repican 10 colonias en MCM para realizar las pruebas de identificación. Si de esas 10 colonias estudiadas. 8 se confirman como *C. perfringens*, se hace el siguiente cálculo:

Nº presuntivo de *C. perfringens*: $100 \times 10^5 = 1 \times 10^7$ colonias presuntivas/g de alimento

Nº de *C. perfringens*

10 colonias presuntivas ————— 8 corresponden a *C. perfringens*

1×10^7 colonias presuntivas ——— 8 x 10^6 *C. perfringens* / g de alimento

Pruebas de identificación

Hidrólisis de la gelatina

Al medio base adicionar 4 g de gelatina para 1 litro de medio. Luego de esterilizar, distribuir 10 ml por placa de Petri.

Sembrar haciendo una estría en la superficie del medio en la porción central o haciendo varias estrías en forma radiada, si se estudian varias cepas o colonias al mismo tiempo. Incubar en anaerobiosis a 35°C durante 2-5 días. Para evidenciar la hidrólisis de la gelatina, cubrir el agar con el siguiente reactivo:

HgCl ₂	15 g
HCl pa. 38%	20 ml
Agua destilada c.s.p	1.000 ml

Disolver el cloruro de mercurio en el ácido y llevar a volumen con el agua. A los 5' eliminar el exceso de reactivo y leer. Considerar el resultado como positivo si aparece una zona clara alrededor de las estrías, en el resto de la placa se observa la formación de un precipitado blanco.

Hidrólisis del almidón

Al medio base adicionar 10 g de almidón soluble para 1 litro de medio. Distribuir y sembrar en placas de Petri, incubar en anaerobiosis a 35°C durante 2-5 días. Sembrar de la misma forma que en hidrólisis de gelatina.

Para evidenciar la hidrólisis del almidón, se cubre el agar con el reactivo (sol. de Lugol diluído aproximadamente 1/10). Considerar el resultado positivo si aparece una zona clara alrededor de las estrías, el resto de la placa toma una coloración oscura.

Investigación de lecitinasa

Al medio base adicionar 10 ml de una emulsión estéril de yema de huevo al 50% para un litro de medio. Distribuir y sembrar en placas de Petri. Incubar en anaerobiosis a 35°C durante 2-5 días. Evidenciar la acción de lecitinasa por la formación de una zona opaca alrededor de la estría. Emulsión de yema de huevo: lavar los huevos con agua destilada, desinfectar la zona a abrir, con alcohol yodado y luego con alcohol puro para eliminar el yodo, flamear, con pinza esterilizada quitar con cuidado la cáscara; con pipeta eliminar totalmente la clara y colocar la yema en una probeta estéril y diluir al doble del volumen con solución salina isotónica.

Producción de hemolisina

Al medio base adicionar 5-10% de sangre desfibrinada estéril. Distribuir, sembrar o incubar como en la prueba anterior. Observar la formación de hemólisis alrededor de la estría, generalmente una doble zona.

Investigación de catalasa

Realizar un cultivo con estría en tubo en pico de flauta con medio base recientemente preparado, incubar en anaerobiosis a 35°C 24-48 h. Verter agua oxigenada al 3% sobre el cultivo y observar si hay o no formación de burbujas.

Preparación del agua oxigenada

Perhidrol (100 vol)	3 ml
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Mezclar una parte del agua destilada al 3% (conservar a 5 °C y en la oscuridad) con dos partes de tampón fosfato 0,1 M pH 7,0.

Movilidad y reducción de nitratos

Regenerar el medio movilidad-nitrato, sembrar con ansa recta por picadura en profundidad y cubrir con aproximadamente 1 ml de parafina líquida. Incubar a 35°C, 24-48 h.

Para evidenciar la formación de nitritos, retirar la parafina y adicionar unos mg del reactivo siguiente:

alfa-naftilamina	1 g
Acido sulfanílico	10 g
Acido tartárico	89 g

Considerar la prueba como positiva si da un color rojo estable. Si la reacción es negativa, agregar al cultivo, conteniendo ya el reactivo, unos mg de polvo de Zn y observar el color después de unos 10'. Si el color no es rojo, esto muestra que el nitrato ya no está presente, anotar el resultado como reducción de nitrato positivo.

Leche hierro

Inocular en un medio leche-hierro 1 ml de un cultivo joven e incubar 18-24 h a 35°C. Se observará un coágulo tumultoso característico.

Medios de cultivo

Agar triptosa sulfito cicloserina (TSC)

Triptosa	15 g
soytone	1 g
Extracto de levadura	5 g
Bisulfito de sodio	1 g
Citrato amónico férrico	1 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

pH: 7,6

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 10'. A cada litro de medio se le agrega en el momento de usar, 40 ml de una solución al 1% de D-cicloserina, para tener una concentración final de 400 mg/ml.

Movilidad nitrato

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Nitrato de potasio	1 g
Agar	3 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

pH: 7,0

Distribuir 10 ml por tubo de 150 x 15 ml y esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15'.

Medio base

Extracto de carne	3 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona	15 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

pH 7,0

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Leche-hierro

Limaduras de hierro	200 g
Leche entera	8 ml

Autoclavar a 121°C durante 10'.

 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Clostridium botulinum*

Muestras de alimentos: Productos vegetales o cárnicos envasados, conservas caseras, jamón, embutidos.

Muestras clínicas: suero, heces.

Clostridium botulinum es un bacilo anaerobio, esporulado, cuyo hábitat natural es el suelo. Produce una neurotoxina responsable de una intoxicación aguda conocida con el nombre de BOTULISMO que afecta al hombre y a algunos animales. Es una enfermedad neurológica de alta letalidad y que generalmente resulta de la ingestión de ciertos

alimentos, en donde se encuentra la toxina preformada. Existen otros casos en que la toxina se produce "in vivo" en el organismo (botulismo del lactante y botulismo por herida).

Hasta el presente, se han descrito 7 tipos serológicos A, B, C, D, E, F y G, y algunos subtipos en base a la estructura antigénica de las toxinas que produce.

Este germen llega a los alimentos, se multiplica y produce su toxina en aquellos que ofrezcan condiciones apropiadas de nutrición, pH, humedad, temperatura y ausencia de oxígeno. Este grupo de alimentos incluye a todos los envasados vegetales o cárneos, caseros o industriales y en algunos no envasados como pueden ser jamón, quesos y embutidos. Se exceptúan los alimentos envasados preservados en vinagre o en salmuera con concentraciones de cloruro de sodio superiores a 7%, los congelados, dulces y alimentos naturalmente ácidos.

La forma de evidenciar la toxina botulínica ya sea a partir de los alimentos, del suero o de las heces de un paciente o de otro material, consiste en filtrar o centrifugar la muestra y luego inyectar 0,5 ml a un ratón por vía intraperitoneal, observándolo durante 4 días. Los signos aparecen generalmente en las primeras 24 h. La muerte está precedida por síntomas específicos de la acción de la toxina a nivel de la placa mioneural que se traduce en una creciente disnea, con formación de la clásica "cintura de avispa" por parálisis progresiva de los músculos respiratorios especialmente del diafragma.

Los pasos a seguir son titulación de la toxina y su tipificación mediante pruebas de neutralización.

Investigación de *C. botulinum* y toxina en alimentos

Tomar distintas partes del alimento buscando las partes centrales, transferir a un mortero estéril y agregar igual volumen de buffer gel fosfato o agua destilada estéril. Homogeneizar cuidadosamente.

Separar en dos alícuotas, una para investigar toxina (a) y la otra para investigar *C. botulinum* viables (b).

a- Investigación de toxina:

Dejar decantar en refrigerador y separar el sobrenadante, el cual es filtrado o centrifugado estérilmente a 2000 g a 4°C durante 20 min. Separar en tres fracciones.

Sobrenadante

Fracción I	Fracción II	Fracción III
Calentar a 100°C, 2'	Sin calentar	Tratar con tripsina
Inocular 2 ratones con 0,5 ml c/u	Inocular 2 ratones con 0,5 ml c/u	Inocular 2 ratones con 0,5 ml c/u

La muerte de los ratones con síntomas y la supervivencia de los que recibieron la preparación calentada, demuestra la presencia de toxina. En este caso se procede a su titulación y tipificación mediante pruebas de neutralización.

La muerte de los ratones sin síntomas puede ocurrir por otros productos tóxicos presentes en el alimento o por traumas.

Tripsinización: ajustar la fracción III a pH 6,2 con NaOH o ClH. Tomar 1,8 ml y agregar 0,2 ml de una solución saturada de tripsina (1 g de tripsina en 10 ml de agua destilada), incubar a 37°C 1 h con agitación ocasional. Enfriar inmediatamente para detener la acción de la tripsina. Inocular.

Las muestras pueden contener tipos de *C. botulinum* no proteolíticos y a veces solo se detectan previa activación de la toxina por tripsina.

b- Investigación de C. botulinum viables

Separar la alícuota en dos fracciones I y II

Homogeneizado

Fracción I	Fracción II
Calentar a 80°C 5 minutos	Sin calentar
Sembrar 2 medios de carne molida	Sembrar 2 medios de carne molida
Incubar 1 tubo a 35°C y el otro a 26°C	Incubar uno a 35°C y el otro a 26°C
Durante 5-10 días	Durante 5-10 días
Inocular 2 ratones por cada tubo para investigar toxina	Inocular 2 ratones por cada tubo para investigar toxina

Observaciones:

La muestra calentada permite eliminar la flora no esporulada, favoreciendo el desarrollo de *C. botulinum*.

La siembra de la muestra sin calentar permite el desarrollo de *C. botulinum* con esporas termosensibles.

Hay cepas de *C. botulinum* que producen mejores títulos de toxina a 26°C que a 35°C.

ACTIVIDADES A DESARROLLAR

- Resolver casos clínicos de intoxicación y/o toxoinfección alimentaria.
- Observar sintomatología de ratones previamente inoculados con toxina botulínica.
- Observar medios de aislamiento y de identificación presuntiva de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*.

BIBLIOGRAFÍA

- Lavigne JP, Tiene B, Jeandrot A, Lechiche C. Toxiinfecciones alimentarias colectivas (TIAC). Acta Bioquím Clín Latinoam 2008; 42 (1): 79-87.
- James MJ. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial AMV. España. 2002