

Textos

Manual práctico de bacteriología clínica

- Judith Velasco (*Coordinadora*)
- María del Carmen Araque
- Emma Araujo
- Aurora Longa
- Beatriz Nieves
- Ana Carolina Ramírez
- Kiralba Sánchez
- Elsa Velazco



Manual práctico de bacteriología clínica

Manual práctico de bacteriología clínica

- Judith Velasco | Coordinadora
- María del Carmen Araque
- Emma Araujo
- Aurora Longa
- Beatriz Nieves
- Ana Carolina Ramírez
- Kiralba Sánchez
- Elsa Velazco

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Autoridades Universitarias

- *Rector*
Léster Rodríguez Herrera
- *Vicerrector Académico*
Humberto Ruiz Calderón
- *Vicerrector Administrativo*
Mario Bonucci Rossini
- *Secretaria*
Nancy Rivas de Prado

PUBLICACIONES
VICERRECTORADO
ACADÉMICO

- *Director*
Humberto Ruiz Calderón
- *Coordinación editorial*
Luis Ricardo Dávila
- *Asistencia editorial*
Yelliza A. García A.
- *Consejo editorial*
Tomás Bandes
Asdrúbal Baptista
Rafael Cartay
Mariano Nava
Román Hernández
Gregory Zambrano

COLECCIÓN
Textos Universitarios

- *Comité editorial*
María del Carmen Araque
Raquel Flores
Bernardo Fontal
Hebert Lobo
Josefina Peña
Marlene Peñaloza
Iris Perdomo
José Villalobos

COLECCIÓN
Textos Universitarios

Publicaciones
Vicerrectorado
Académico

Manual práctico de bacteriología clínica

Primera edición, 2008

- © Universidad de Los Andes
Vicerrectorado Académico,
CODEPRE
- © Judith Velasco, María del Carmen Araque, Emma Araujo,
Aurora Longa, Beatriz Nieves, Ana Carolina Ramírez, Kiral-
ba Sánchez, Elsa Velazco.
- *Concepto de colección
y diseño de portada*
Katalin Alava
- *Corrección de texto*
Freddy Parra Jahn
- *Diagramación*
Jilmor Gilson | DINAMICA Art Design Studio
- *Dibujos*
Ana Carolina Ramírez
- *Impresión*
Editorial Venezolana C. A.

HECHO EL DEPÓSITO DE LEY
Depósito Legal: LF23720085891416
ISBN: 978-980-11-1157-3

Prohibida la reproducción
total o parcial de esta obra
sin la autorización escrita
del autor y el editor

Universidad de Los Andes
Av. 3 Independencia
Edificio Central del Rectorado
Mérida, Venezuela
publicacionesva@ula.ve
<http://viceacademico.ula.ve/>
publicacionesva

Los trabajos publicados en la
Colección Textos Universitarios
han sido rigurosamente
seleccionados y arbitrados
por especialistas en las
diferentes disciplinas.

Impreso en Venezuela
Printed in Venezuela

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
Autoridades Universitarias

- *Rector*
Mario Bonucci Rossini
- *Vicerrectora Académica*
Patricia Rosenzweig
- *Vicerrector Administrativo*
Manuel Aranguren Rincón
- *Secretario*
José María Andrés

PUBLICACIONES
VICERRECTORADO
ACADÉMICO

- *Dirección editorial*
Patricia Rosenzweig
- *Coordinación editorial*
Victor García
- *Coordinación del Consejo editorial*
Roberto Donoso
- *Consejo editorial*
Rosa Amelia Asuaje
Pedro Rivas
Rosalba Linares
Carlos Baptista
Tomasz Suárez Litvin
Ricardo Rafael Contreras
- *Producción editorial*
Yelliza García A.
- *Producción libro electrónico*
Miguel Rodríguez

Primera edición digital 2011

Hecho el depósito de ley

Universidad de Los Andes
Av. 3 Independencia
Edificio Central del Rectorado
Mérida, Venezuela
publicacionesva@ula.ve
publicacionesva@gmail.com
www2.ula.ve/publicacionesacademico

Los trabajos publicados en esta Colección han sido rigurosamente seleccionados y arbitrados por especialistas en las diferentes disciplinas

Prefacio

Las enfermedades infecciosas en los últimos tiempos han mantenido un lugar preferencial en el área médica, sobre todo por la aparición de enfermedades virales como el SIDA y el resurgimiento de cuadros infecciosos que se creían controlados como la tuberculosis. Por otra parte, el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro ha incrementado la resistencia a los antimicrobianos y la circulación de cepas multirresistentes en los ambientes hospitalarios, situación que dificulta el manejo de pacientes hospitalizados.

Es por ello, que el clínico recurre al laboratorio de Microbiología con el único propósito de obtener resultados confiables y en el menor tiempo posible. En tal sentido, el presente manual se ha diseñado de manera que sirva de texto guía para los estudiantes de Bioanálisis que cursan la asignatura Microbiología clínica y aplicada e, igualmente, de texto de consulta rápida de los profesionales del laboratorio de Microbiología. Tiene por objetivo mostrar los recursos y técnicas convencionales para el diagnóstico de algunas de las enfermedades infecciosas más frecuentes; se hace énfasis en los procedimientos a seguir de acuerdo a la impresión clínica inicial, aislamiento, identificación, pruebas de susceptibilidad de los microorganismos involucrados, interpretación y reporte de los resultados.

Las metodologías descritas se presentan en una forma clara y sencilla, su presentación gráfica en forma de figuras a color facilita la comprensión global de las técnicas utilizadas para el diagnóstico microbiológico.

La elaboración del presente manual es producto del conocimiento y experiencia de varios profesionales del área de microbiología adscritos al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Es importante mencionar, que en los últimos años se han desarrollado nuevas tecnologías que escapan al objetivo de este manual, pero que pueden ser consultadas en otras bibliografías especializadas.

Judith Velasco Carrillo
Prof.^a de la Cátedra de Bacteriología

práctica 1

Principios diagnósticos de las enfermedades infecciosas

María del Carmen Araque

Objetivo general

Introducir al estudiante en la aplicación de conocimientos técnico-científicos para el diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas.

Objetivos específicos

1. Describir la importancia clínica y microbiológica de las diferentes etapas que conforman el procesamiento microbiológico de una muestra clínica y su relación con el éxito o fracaso en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.
2. Reforzar las destrezas prácticas adquiridas en Microbiología general, en cuanto a la realización de técnicas de coloración e inoculación de medios sólidos para aislamientos primarios.

Aspectos teóricos

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se realiza sobre la base de los signos y síntomas clínicos que presenta el paciente, los datos epidemiológicos y la demostración del agente causal o las huellas que éste ha dejado en el sistema inmunológico del individuo. (1)

El papel del laboratorio de microbiología clínica consiste en determinar la presencia de patógenos potenciales en los tejidos, los líquidos corporales o las secreciones de los pacientes, e identificarlos en caso de que estén presentes. Este servicio es indispensable para el médico tratante, porque la información acerca de la identidad del patógeno

es de importancia primordial para predecir el curso de la infección y orientar o decidir la conducta terapéutica más apropiada. Esta información puede obtenerse por medio de cuatro formas posibles: (1,2)

- El cultivo y la identificación de los microorganismos a partir de muestras clínicas.
- El examen microscópico de la muestra clínica.
- La medición o cuantificación de la respuesta inmune específica para el patógeno en el paciente.
- La detección de moléculas específicas de los patógenos en las muestras de los pacientes.

La extensión y la confiabilidad de la información que puede proporcionar el laboratorio varían de acuerdo con la naturaleza del patógeno. Algunos de ellos son fáciles de detectar, cultivar, identificar y caracterizar (*Escherichia coli*); otros requieren medidas extraordinarias tan sólo para detectar su presencia (*Helicobacter pylori*). Sin embargo, las capacidades del laboratorio de microbiología clínica se están ampliando y perfeccionando aceleradamente, gracias a los avances tecnológicos y científicos en el campo de la biología molecular, han permitido introducir, cada vez más rápido, nuevos métodos diagnósticos en la práctica clínica.

La principal conexión entre el médico y el laboratorio de microbiología clínica es la muestra que se recolecta y se envía para su procesamiento.(1-3) Es por ello, que la recolección correcta de una muestra clínica para su cultivo es la etapa más importante en el aislamiento exitoso de un microorganismo responsable de una determinada enfermedad infecciosa (Fig. 1).

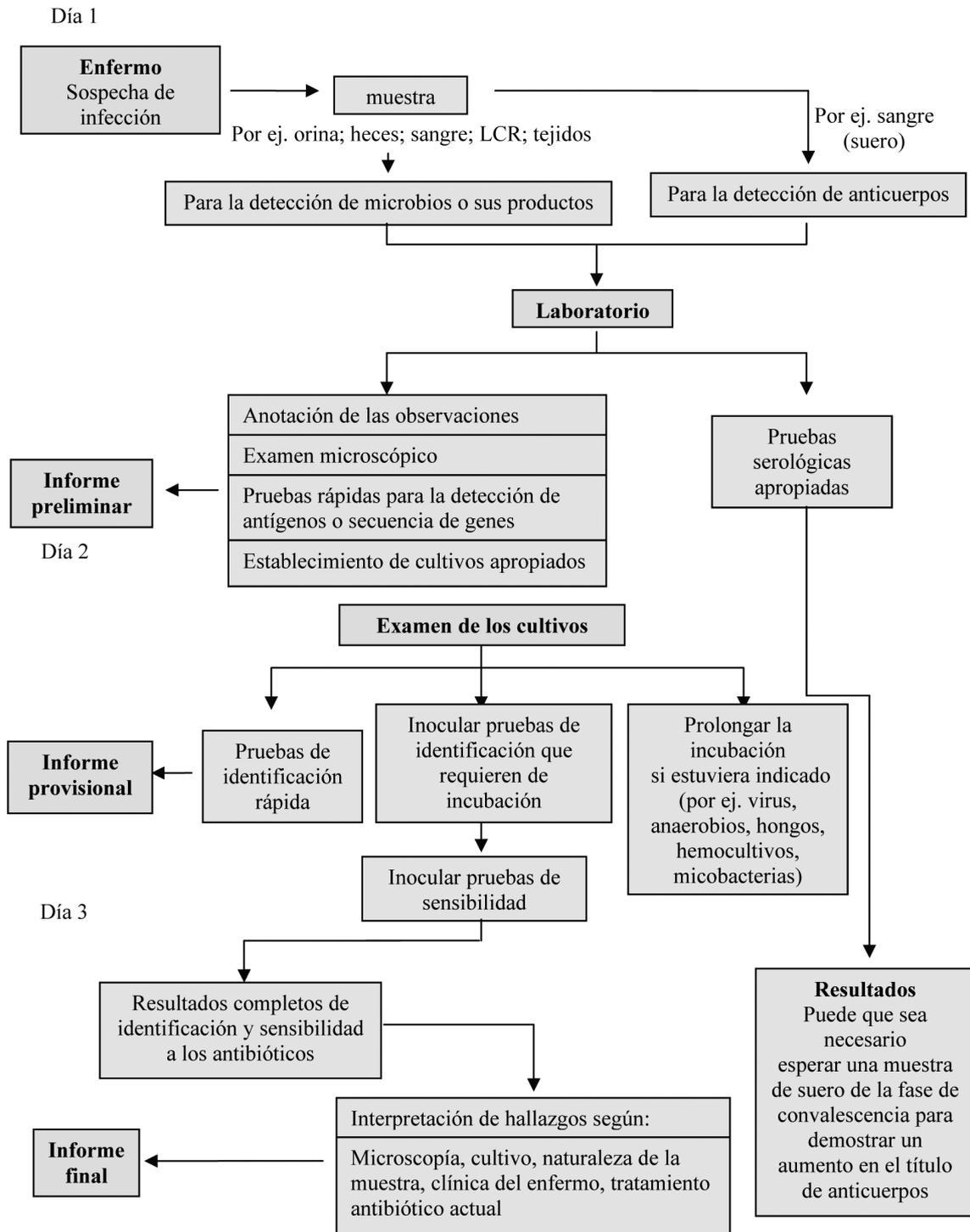


Figura 1. Estudio microbiológico de una muestra clínica
Tomado de: Mims y col., 1995

Una muestra deficientemente recogida puede ser motivo de confusión al momento de aislar el agente etiológico. La recuperación de gérmenes contaminantes puede conducir a un diagnóstico microbiológico equivocado y, en consecuencia, a la instalación de una terapia incorrecta, que en algunos casos puede agravar el cuadro clínico del paciente. Por otro lado, se debe tener en cuenta que la piel y todas las superficies de las mucosas están normalmente colonizadas por una flora habitual. Sin embargo, con frecuencia estas superficies pueden adquirir una flora transitoria o, incluso, ser colonizadas por patógenos potenciales provenientes del medio ambiente. En consecuencia, se deben emplear procedimientos especiales que permitan distinguir los verdaderos microorganismos implicados en un proceso infeccioso, de aquellos provenientes de la flora saprófita y/o de los que son colonizadores “anormales” que no están causando ninguna infección (Tablas 1 y 2).

TABLA 1. Algunos sitios de infección y sus posibles fuentes de contaminación con flora saprófita

Sitio de infección	Fuente de contaminación
Vejiga	Uretra y perineo
Sangre	Sitio de punción
Cuello uterino y endometrio	Vagina
Fístula	Tracto gastrointestinal
Oído medio	Piel del conducto auditivo externo
Cornetes nasales	Nasofaringe
Infecciones subcutáneas y heridas superficiales	Piel y mucosas
Tracto respiratorio superior	Cavidad oral y nasofaringe

Para orientarnos a resolver este problema debemos considerar lo siguiente: (1-4)

1. La obtención de líquidos normalmente estériles (sangre, LCR, etc.) por aspiración con aguja percutánea deberán ser precedidos siempre por una exhaustiva descontaminación de la piel. Por lo tanto, se deberán extremar los cuidados de asepsia y antisepsia en aquellas áreas normalmente contaminadas. El alcohol al 70% es satisfactorio para la piel, sin embargo, debe dejarse actuar, por lo menos, 2 minutos. El yodo (2%) y la povidona yodada son muy efectivos y de actividad rápida (1 minuto) contra todos los microorganismos, incluso, los formadores de esporas.
2. Realizar cultivos cuantitativos que permitan determinar que el microorganismo aislado es el responsable de la patología infecciosa (contaje de colonias, Ej: urocultivos). Una cuantificación menos rigurosa puede ser adoptada como rutina, mediante la implementación de una escala que oscile entre 0 a 4 cruces, o simplemente, expresar el desarrollo de microorganismos como crecimiento escaso, moderado o abundante.

3. Considerar la posibilidad de recolectar la muestra en forma seriada y evaluar los cultivos de acuerdo al criterio anterior.

TABLA 2 . Muestras que no deben ser procesadas debido a su cuestionable información microbiológica

Tipo de muestra no adecuada	Alternativa o comentario
Exudados de heridas por quemaduras	Biopsia o aspirado
Descarga de colostomía	No procesar
Exudados de úlceras de decúbito	Biopsia o aspirado
Punta de catéter de Foley	No procesar
Aspirado gástrico en recién nacidos	No procesar
Loquios	No procesar
Exudados de absceso perirectal	Biopsia o aspirado
Exudado de lesión gangrenosa	Biopsia o aspirado
Exudado de lesión periodontal	Biopsia o aspirado
Exudado de lesión varicosa	Biopsia o aspirado
Vómitos	No procesar

Normas básicas para la recolección correcta de muestras biológicas

1. La muestra para cultivo debe proceder, de ser posible, del verdadero sitio de la infección y deberá recogerse con un mínimo de contaminación de tejidos, órganos o secreciones adyacentes.
2. Se establecerán los períodos óptimos para la recolección de las muestras de acuerdo al proceso natural de la enfermedad y del microorganismo posiblemente involucrado. Esto se realiza con la finalidad de aumentar las posibilidades de recuperar y aislar el agente etiológico.
3. Obtener la suficiente cantidad de muestra para llevar a cabo todas las pruebas y técnicas de cultivo solicitadas.
4. Utilizar dispositivos de recolección, recipientes para las muestras y medios de transporte adecuados para asegurar el óptimo aislamiento de los microorganismos.
5. Siempre que sea posible, se deberán obtener las muestras clínicas antes de la administración de antibióticos.
6. El envase o los dispositivos de recolección de muestras clínicas deberán estar correctamente rotulados y fechados.

Factores que influyen en el aislamiento de microorganismos

- Localización del proceso infeccioso.
- Técnica y material utilizado para coleccionar la muestra.
- Medio de transporte en el cual la muestra es colocada.
- Tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su procesamiento en el laboratorio.

Transporte de muestras biológicas

El principal objetivo del transporte de muestras clínicas dentro y fuera de un hospital, es la preservación del material biológico lo más semejante a su estado original, con un mínimo de deterioro y sin riesgos de contaminación para quien manipula estas muestras (Tabla 3).

TABLA 3. Sistemas de transporte y condiciones de almacenamiento de muestras*		
Sistema de transporte	Condiciones de almacenamiento	
	4°C	25°C
Sin preservar	Tejido de autopsia, lavado bronquial, catéter endovenoso, fluido pericárdico, esputo, biopsia de pulmón, orina, muestras con sospecha de agentes virales.	LCR, líquido sinovial, líquido pleural, líquido ascítico, agentes bacterianos.
Transporte para anaerobios		Líquido abdominal, líquido amniótico, líquido biliar, aspirado transtraqueal, material profundo de heridas, aspirado sinusal, biopsia, orina, aspirado suprapúbico.
Muestras inoculadas directamente en el medio de cultivo		Raspado corneal, hemocultivo, secreción uretral y humor vítreo.
Medio de transporte	Biopsia de heridas, secreción de oído externo, muestras de heces en donde se sospecha la presencia de <i>Shigella</i> sp., <i>Vibrio</i> sp. y <i>Yersinia</i> sp.	Tejido óseo, hisopado cervical, hisopado conjuntival, secreción de oído externo, hisopado vaginal, hisopado nasofaríngeo, exudado de tracto respiratorio superior.

* Condiciones de almacenamiento máximo por 24 horas.

En la actualidad se dispone de una variedad de recipientes para la recolección y transporte de muestras clínicas tales como: placas de Petri, jeringas y agujas para aspiración, tubos o viales con medio de transporte, sistema de tubo plástico con medio

de transporte e hisopo para bacterias aerobias y anaerobias (Culturette System[®] BBL), sistema de bolsas biológicas para bacterias microaerófilas estrictas y anaerobios (Pouch System[®] Difco), entre otras. Sin embargo, el equipo de recolección de muestras más utilizado es el hisopo de madera con punta de algodón, alginato o dacrón. La selección del tipo de hisopo estará determinada de acuerdo al microorganismo en sospecha en la muestra clínica. Una vez recolectada la muestra, el hisopo es introducido en el medio de transporte. Este procedimiento suministrará la humedad suficiente a la muestra hasta por 72 horas.

Los medios para el transporte de muestras más utilizados y que permiten la viabilidad de la mayoría de los patógenos son: el medio de Stuart, Cary-Blair y el de Amies. Estos medios semisólidos tienen un pH regulado y son esencialmente una mezcla de sustancias tamponadas que carecen de factores de crecimiento. Se les adiciona un agente reductor como el tioglicolato de sodio para mejorar la recuperación de bacterias anaerobias. En otros casos, se aconseja agregar borato de sodio para preservar el transporte de muestras donde se sospecha la presencia de micobacterias.

Es importante destacar que aunque los hisopados son la forma más comúnmente utilizada para el envío de muestras, se prefiere que la muestra sea enviada en la mayor cantidad posible (una jeringa o en un vial), de manera que se pueda garantizar su procesamiento para la mayor cantidad estudios y técnicas bacteriológicas. Asimismo, si se sospecha que los microorganismos son escasos, cuanto mayor sea la muestra, mejores serán las probabilidades de aislar el patógeno involucrado.(5)

En los capítulos subsiguientes que conciernen a la actividad práctica de laboratorio, se describen los métodos de recolección y el manejo de las muestras clínicas de acuerdo al proceso infeccioso y al área anatómica involucrada.

Procesamiento de las muestras clínicas

Toda muestra que se recibe en el laboratorio de microbiología se debe examinar visualmente o microscópicamente a fin de evaluar si es adecuada para su posterior procesamiento. Si hay evidencia de que la muestra ha sido recogida incorrectamente, si hay cantidad insuficiente de material, si el recipiente es inadecuado o si hubo excesiva demora en el envío, se debe recomendar la recogida de una segunda muestra.

El examen microscópico de las muestras clínicas es de gran importancia. No sólo puede convalidar la calidad de las muestras, sino también, identificar algunos patógenos por sus características morfológicas, movimientos o propiedades de tinción particular.

En ciertas infecciones el diagnóstico microscópico es altamente sensible y específico (Tabla 4). También representa una técnica rápida que permite que el médico inicie un tratamiento sin tener que esperar los resultados del cultivo.

TABLA 4. Muestras clínicas y examen directo		
Muestra clínica	Impresión diagnóstica	Examen directo
Exudado faríngeo	Difteria.	Azul de metileno de Loeffler
	Faringitis o faringoamigdalitis bacteriana.	Gram
Úlceras orofaríngeas	Angina de Vincent.	Gram
Espujo aspirado transtraqueal Lavado bronquial	Bronconeumonía o neumonía bacteriana. Tuberculosis. Micosis pulmonar.	Gram Ziehl Neelsen Azul de Lactofenol
Heridas cutáneas o secreciones purulentas de piel o mucosas	Celulitis bacteriana, furunculosis. Heridas quirúrgicas infectadas, úlceras de decúbito, entre otras. Mionecrosis. Micetoma.	Gram Solución Salina. Kinyoun Azul de Lactofenol
Líquido cefalorraquídeo	Meningitis bacteriana. Meningitis criptocócica.	Gram Tinta china
Orina	Infección urinaria bacteriana. Leptospirosis.	Gram Campo oscuro
Secreción uretral o cervical purulenta	Gonorrea. Infección no gonocócica. Candidiasis.	Gram Giemsa Al fresco o Azul de lactofenol
Exudado de úlcera en genitales (chancro)	Sífilis.	Campo oscuro
Secreción ocular o raspado corneal	Conjuntivitis purulenta. Tracoma.	Gram Giemsa
Raspados de piel, fragmentos de uñas o pelos	Dermatofitosis. Pitiriasis versicolor. Candidiasis.	KOH al 40% Azul de lactofenol

El examen en fresco de materiales clínicos sin colorear, por microscopía de contraste de fase o campo oscuro, es útil para demostrar la presencia y movilidad de bacterias como las espiroquetas (*Treponema pallidum*). Muchos patógenos fúngicos también tienen aspectos morfológicos característicos. De manera notable, la meningitis por *Cryptococcus neoformans* se diagnostica con mayor rapidez por el hallazgo de la levadura encapsulada en líquido cefalorraquídeo. Mediante la tinción de fondo con tinta china se visualiza la cápsula transparente de la levadura. Si bien los virus no pueden verse con el microscopio óptico, los cambios inducidos por ellos en la morfología de las células hospedadoras pueden ser diagnósticos. Ejemplos de ello son las células gigantes multinucleadas observadas en el material

de raspado de las lesiones producidas por el virus herpes simple o el virus de la varicella zoster (frotis de Tzanck) y los cuerpos de inclusión intracelular específicos observados en los tejidos activamente infectados por citomegalovirus.

Los patógenos bacterianos pueden ser visualizados y agrupados de forma morfológica y funcional utilizando tinciones especiales como la de Gram o la coloración de Ziehl Neelsen.

La tinción de Gram es rápida y simple de llevar a cabo y puede emplearse en casi todos los líquidos o tejido corporal (el fundamento y los pasos de la tinción pueden consultarse en el *Manual práctico de microbiología general*). Esta tinción proporciona tres tipos de información básica:

- Puede confirmar la presencia de bacterias en un líquido o tejido corporal normalmente estéril (LCR, sangre, entre otros).
- Las propiedades tintoriales y la morfología de los microorganismos en la muestra o en el cultivo permiten establecer las estrategias de identificación definitiva del patógeno y la selección de los antibióticos a probar en el antibiograma.
- La observación de algunos tipos morfológicos puede ser diagnóstica en algunos casos por ejemplo; diplococos gramnegativos intracelulares en polimorfonucleares en muestras de secreción uretral es altamente sugestivo de *Neisseria gonorrhoeae*.

Las micobacterias poseen una pared celular gruesa y cerosa, de manera que cuando son teñidas, por ejemplo, con la coloración de Ziehl Neelsen, estas son resistentes a la decoloración al someterse al tratamiento con potentes solventes orgánicos tales como el alcohol ácido. En consecuencia, los microorganismos que tienen esta propiedad se llaman acidorresistentes. Un ejemplo característico de este grupo de bacterias son las pertenecientes al género *Mycobacterium*.

Aislamiento e identificación bacteriana por métodos convencionales

El crecimiento e identificación del agente etiológico *in vitro* casi siempre es el recurso diagnóstico más sensible y específico, y por eso es el método más usual. Casi todas las bacterias de importancia médica pueden cultivarse fuera del hospedador, en medios artificiales de cultivo.

Las muestras destinadas al cultivo de microorganismos se pueden dividir en dos tipos, según su procedencia de sitios estériles o de lugares normalmente contaminados con flora saprófita. Es importante tener un conocimiento profundo de los microorganismos aislados comúnmente en muestras clínicas no estériles y de los contaminantes frecuentes en muestras provenientes de sitios estériles, para asegurar que todas esas muestras serán tratadas adecuadamente y los resultados interpretados correctamente.

Es posible cultivar la mayoría de las especies de bacterias y hongos de importancia clínica en medios artificiales, pero no existe un medio de cultivo universal que permita el crecimiento de todas ellas, y hay algunas especies que sólo pueden cultivarse en animales de experimentación (*Mycobacterium leprae* y *Treponema pallidum*). Otras bacterias son imposibles de cultivarlas en medios artificiales (*Chlamydia* sp. y *Rickettsia* sp.) pero se desarrollan muy bien en líneas celulares.

Una vez que se detecta el crecimiento bacteriano en un medio de cultivo para aislamiento inicial o primario, debe determinarse la importancia real de la bacteria que se ha aislado. Luego, se continuará con el proceso de obtener cultivos puros a partir de colonias aisladas y la aplicación de pruebas diseñadas para la caracterización e identificación definitiva de la bacteria. Las pruebas exactas y la estrategia metodológica a seguir varían con los distintos grupos bacterianos, y el nivel taxonómico (género, especie o subespecie) de identificación requerido estará en relación con la utilidad o importancia clínica que se le dé a esa información. En la sección de anexos se describen las pruebas claves requeridas para identificar los principales grupos y especies bacterianas de importancia médica.(2-5)

Los métodos convencionales para la identificación de los microorganismos se fundamentan principalmente en:

1. **Pruebas bioquímicas:** evalúan la capacidad metabólica de un microorganismo relacionado con:
 - Los sustratos que puede utilizar la bacteria para crecer (hidratos de carbono, aminoácidos, entre otros).
 - Las enzimas que posee la bacteria (descarboxilasas, ureasas, peroxidasas, entre otras).
 - Los productos metabólicos producidos por las bacterias (ácido fórmico, succínico, butírico, entre otros).
 - La capacidad para metabolizar azúcares por oxidación o fermentación.
 - La capacidad de reducir ciertos iones (ferroso a férrico).
 - La capacidad de movilidad por la presencia de flagelos.
 - La producción o no de hemolisinas.
 - El requerimiento o no de ciertos factores especiales para el crecimiento bacteriano (vitamina K, isovitalex, factor V y/o X, entre otros).
 - La producción o no de algunas toxinas con capacidad virulenta.
2. **Pruebas de tolerancia:** se refiere a la capacidad que pueda tener la bacteria para crecer a distintos tipos de temperaturas, atmósfera, pH, sales presentes en el medio, antibióticos, entre otras.

Existen métodos que utilizando los fundamentos del diagnóstico convencional se han diseñado para proporcionar resultados rápidos. Entre los más conocidos tenemos:

- **Sistema API:** es, entre los sistemas de identificación más rápidos, el más conocido. Posee un gran número de pruebas bioquímicas, las cuales se presentan como sustratos liofilizados en una galería de pozos y se requiere sólo de un inóculo estandarizado a partir de cultivos puros y frescos, y un tiempo de incubación posterior que depende de la galería de pruebas que se haya escogido. La identificación se realiza partiendo de un sistema de códigos que se introducen en una computadora cargada con un software específico y que identifica la bacteria mediante un banco de datos.
- **Sistema Sens-Ident:** este sistema utiliza placas de microtitulación y en sus pocillos tienen sustratos liofilizados. Este sistema también utiliza un inóculo estandarizado. Requiere de un tiempo mínimo de incubación (16 a 18 h) y la lectura se realiza mediante un lector automatizado.
- **Sistema VITEK:** el sistema VITEK consta de un módulo de vacío-sellador, un incubador-lector, un computador, el monitor y la impresora. Permite identificar bacterias hasta en 3 horas. Se utilizan sustratos liofilizados y se requiere de un inóculo estandarizado, y es en los módulos del equipo donde se realiza el llenado y sellado de las tarjetas, la incubación y la lectura. El software proporcionado con el computador es el que analiza las lecturas en cada una de las tarjetas comparándolas con una base de datos, generando de esta forma el resultado de acuerdo con el teorema de Bayes.
- **Sistema MicroScan:** este sistema consiste en placas plásticas de microtubos, que llevan incorporados sustratos reactivos para la identificación de bacterias aerobias, anaerobias y levaduras. Algunas placas también incluyen microdilución en caldo de ciertos antibióticos, lo que permite realizar estudios de sensibilidad. Las placas o paneles de MicroScan contienen sustratos y antibióticos deshidratados. Los microtubos son inoculados con una suspensión del microorganismo estandarizado e incubados a 36 °C por 15 a 18 horas, después de este período puede realizarse una lectura en forma visual a los paneles o usar un sistema automatizado de lectura. En este último caso, el equipo detecta el crecimiento bacteriano o los cambios de color suscitados en los microtubos por diferencias en la transmisión de luz. Las diferencias en las pulsaciones electrónicas son analizadas automáticamente por un microcomputador que compara los patrones de reacción con un programa interno para determinar la probabilidad de identificación.

Métodos no convencionales para el diagnóstico microbiológico

Inmunodiagnóstico. También conocido como serología diagnóstica. Se utilizan pruebas que permiten la interacción antígeno anticuerpo para diagnosticar enfermedades infecciosas, así como para identificar microorganismos. En el caso de que se realice el diagnóstico de infección en el hospedero susceptible, este método basado en la serología presenta una desventaja, que es su carácter retrospectivo, ya que deben transcurrir de 2 a 4 semanas an-

tes de que puedan detectarse en el suero del paciente las IgG producidas como respuesta a la infección. Por otra parte, un resultado positivo sólo indica que el paciente ha estado en contacto con la infección en algún momento del pasado. Sin embargo, las IgM se pueden detectar en períodos más tempranos de la infección (7-10 días), indicando infección activa. En este contexto, es importante destacar que la respuesta inmunológica observada en un paciente dependerá de la integridad de su sistema inmunológico. El inmunodiagnóstico es el principal método utilizado para el diagnóstico de laboratorio de enfermedades virales.

Las pruebas para la detección de antígenos son como pruebas serológicas invertidas, en lugar de emplear antígenos microbianos para capturar los anticuerpos específicos en el suero de un paciente, en este caso se emplean anticuerpos “de captura” para detectar en las muestras clínicas antígenos específicos del microorganismo. En la mayor parte de estas pruebas los anticuerpos “de captura” se encuentran unidos a un soporte sólido, tal es el caso del uso de bolitas de látex recubiertas con anticuerpos específicos (aglutinación con látex) para detectar el material capsular de los meningococos, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Cryptococcus neoformans*, entre otros (Fig. 2). En muchas ocasiones, este panel de pruebas es utilizado en muestras de líquido cefalorraquídeo para establecer el diagnóstico precoz de meningitis.(1,4,5)

Las pruebas serológicas usadas más frecuentemente en el laboratorio para el diagnóstico de enfermedades infecciosas son:

- Precipitación
- Aglutinación
- Hemaglutinación
- ELISA
- Inhibición de la hemaglutinación
- Fijación de complemento
- Técnicas de anticuerpos fluorescentes

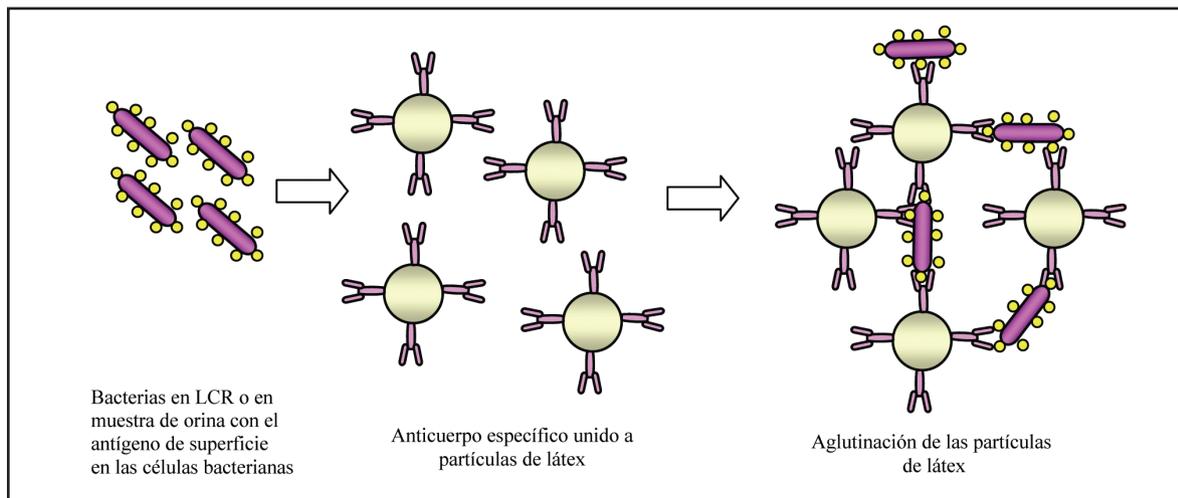


Figura 2. Prueba de aglutinación con látex

Tomado de Mims y col., 1995

Métodos moleculares de diagnóstico en enfermedades infecciosas. El uso de la biología molecular para el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades infecciosas se basa en las características de los ácidos nucleicos como códigos únicos de identificación de todo ser viviente.

El primer paso en el desarrollo de metodologías basadas en técnicas de biología molecular se sustentó en la detección de los ácidos nucleicos del microorganismo mediante una sonda. La sonda genética es una molécula de ácido nucleico que, una vez en estado monocatenario y marcada, se puede usar para detectar una secuencia complementaria de ADN hibridándola con ella. Las sondas de oligonucleótidos se obtienen a partir de ADN natural, mediante clonación de fragmentos de ADN en vectores plásmidos apropiados y aislando posteriormente el ADN clonado. Sin embargo, si se conoce la secuencia del gen que interesa, es posible sintetizar la sonda específica que corresponde. Las sondas se pueden marcar con isótopos radiactivos o con sustancias que produzcan reacciones de color en condiciones adecuadas.(5-7)

La construcción de sondas de virulencia como las toxinas, permite detectar los organismos que portan esos genes en las muestras clínicas, sin necesidad de cultivarlos. Un ejemplo de ello, es la sonda para las enterotoxinas de *Escherichia coli* o para la toxina de *Vibrio cholerae*, las cuales se pueden aplicar directamente en muestras de material fecal.

En la actualidad el desarrollo de sondas comerciales para el diagnóstico de enfermedades infecciosas va en aumento, pero la detección de un pequeño número de organismos o pocas copias de gen en la muestra clínica es un factor limitante en esta técnica. Sin embargo, la combinación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) con la hibridación con sondas puede convertirse en el método de elección, especialmente para microorganismos cuyo cultivo en el laboratorio resulta lento o difícil.(6,7)

La RCP es una técnica de amplificación que permite detectar y replicar en forma selectiva una porción determinada del genoma. La técnica usa polimerasas de ADN especiales que pueden manipularse mediante cambios alternos en las condiciones de prueba (temperatura) para que se inicie la replicación en dirección 3' o 5'. La especificidad la establecen los cebadores que reconocen sitios específicos en la cadena de ADN, de tal forma que el segmento intermedio entre los cebadores puede replicarse mediante ciclos repetidos de las condiciones de prueba. Cada fragmento recién sintetizado sirve como molde para su propia replicación, por lo tanto, la cantidad de ADN se duplica en cada ciclo (Fig. 3).

Otras técnicas moleculares utilizadas en el diagnóstico de enfermedades infecciosas son:

- Ribotipificación
- PCR fingerprinting

- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción RFLP
- Oligotipificación

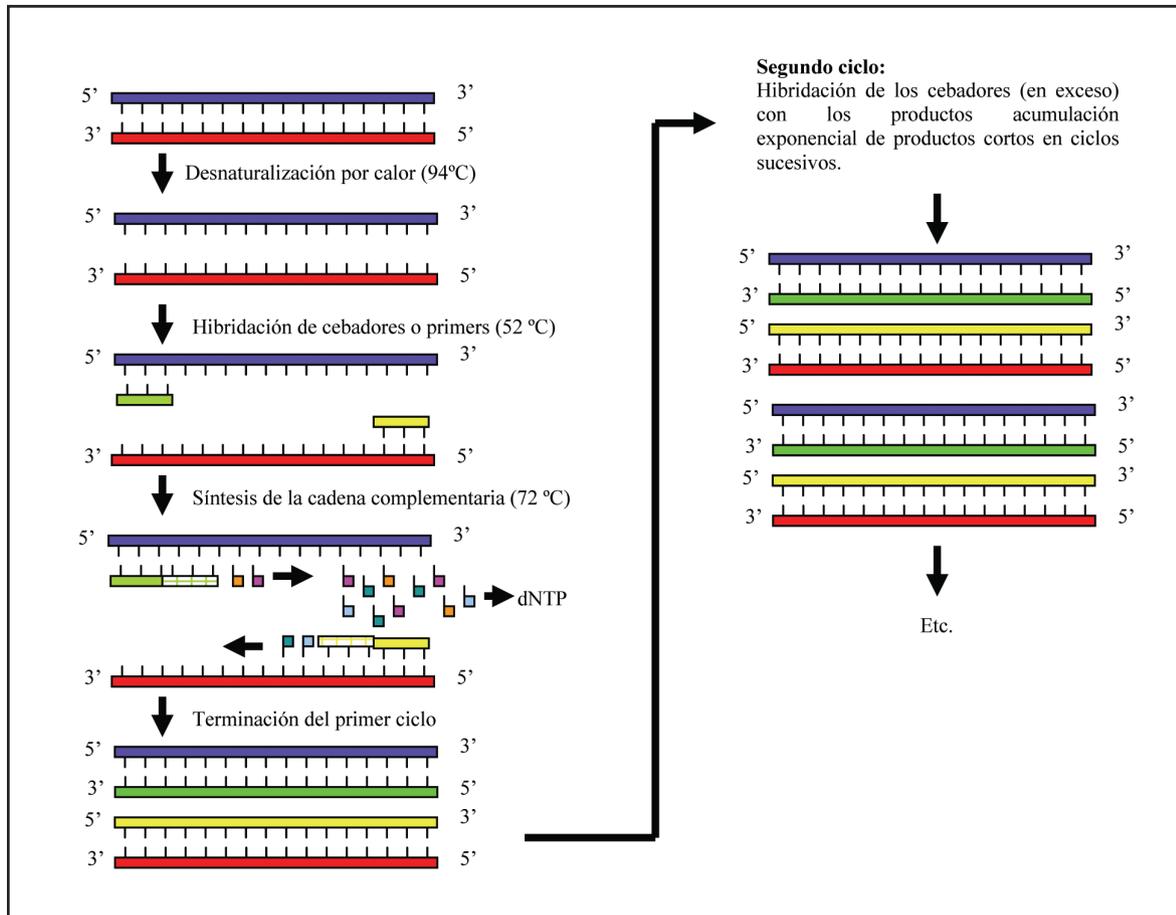


Figura 3. Amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa
Tomado de: Engleberg NC., 1994

1 Actividad práctica

1. Realizar la tinción de Gram en frotis de muestras clínicas asignadas a cada equipo de trabajo.
2. Observar e interpretar los frotis coloreados.
3. A partir de las muestras clínicas asignadas a cada equipo de trabajo, los estudiantes realizarán la inoculación de las mismas en medios de cultivo sólidos para aislamiento primario.
4. En el segundo período de práctica, el estudiante evaluará e interpretará los resultados obtenidos en los cultivos primarios.

Autoevaluación

1. ¿Por qué se considera importante conocer la flora habitual del organismo en el momento de realizar estudios microbiológicos?
2. ¿Existen circunstancias en las que la flora habitual se convierte en patógena?
3. ¿Cuáles consideraciones previas deberían tenerse en cuenta a la hora de realizar la toma de una muestra clínica?
4. ¿Cuál es la importancia estratégica que tiene el examen directo al momento de procesar una muestra clínica?
5. ¿Cuál es el fundamento de las pruebas convencionales en el diagnóstico de enfermedades infecciosas?
6. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas que tienen los métodos no convencionales en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas?

Bibliografía

- (1) Drew LW., Cockerill FR, Henry NK. In: Wilson Wr, Sande MA. Current. Diagnosis & treatment in infectious diseases. International Edition. United States: McGraw-Hill Companies; 2001. p. 43-64.
- (2) Engleberg NC. Principios diagnósticos. En Schaechter M, Medoff G, Eisenstein BI, Guerra H. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. 2ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1994. p. 691-708.
- (3) Mims CA, Playfair JHL, Roitt IM, Wakelin D, Williams R, Anderson RM. Microbiología médica. España: Mosby/Doyma; 1995. p. 17.1-18.15.
- (4) Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Tenover FC. Microbiología médica. 4ª ed. España: Mosby Elsevier Science; 2002. p. 153-170.
- (5) Montiel F, Lam M. Selección, recolección y transporte de muestras para el estudio microbiológico. En Montiel F, Lam M. Manual de microbiología clínica. Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo; 2001. p. 17-52.
- (6) Podestá O, Sturba E, Casimir L. Métodos moleculares de diagnóstico y seguimiento. En Stamboulian D. Temas de infectología clínica. Colombia McGraw-Hill Interamericana; 2002. p. 139-58.
- (7) Ryan KJ, Tenover FC. Principios de diagnóstico por laboratorio de las enfermedades infecciosas. En Ryan KJ, Tenover FC. Sherris Microbiología médica. 4ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004. p. 251-82.

práctica 2

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

María del Carmen Araque

Objetivo general

Determinar la importancia clínica y microbiológica de las pruebas de susceptibilidad.

Objetivos específicos

1. Elaborar correctamente un antibiograma de acuerdo al método de difusión del disco.
2. Conocer los criterios que permiten la escogencia adecuada de los discos de antibióticos a probar en un antibiograma.
3. Interpretar y elaborar correctamente el reporte de un antibiograma.

Aspectos teóricos

El aislamiento e identificación de un agente infeccioso a partir de una muestra clínica proveniente de un paciente, no es suficiente para impartir una terapia antiinfecciosa adecuada. Actualmente, numerosos microorganismos han desarrollado múltiples mecanismos que les permiten resistir a la acción de los más nuevos y potentes agentes antimicrobianos.

Como no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos, en la actualidad se dispone de varios métodos para determinar el patrón de susceptibilidad de una bacteria a los antibióticos. Entre los métodos más utilizados podemos mencionar: (1)

1. Método de difusión del disco en agar (prueba de Kirby-Bauer).
2. Antibiograma ATB Rapid (bioMérieux).
3. Método de dilución en caldo o en agar (Concentración Inhibitoria Mínima [CIM]).
4. Método de la cinta o Epsilómetro Etest^R (AB BIODISK).

Otro aspecto importante que se debe tener en cuenta en la realización de las pruebas de susceptibilidad, es la elección correcta de los antibióticos a probar. A continuación se señalan algunos criterios que pueden ayudar a seleccionar adecuadamente dichos agentes: (1-3)

1. Microorganismo aislado.
2. Mecanismo de acción del antibiótico.
3. Espectro de acción del antibiótico.
4. Biodisponibilidad del antibiótico en órganos y sistemas (localización de la infección).
5. Origen o fuente de la infección (hospitalaria o extrahospitalaria).
6. Estados fisiológicos del paciente (edad, embarazo, entre otros).
7. Estados patológicos subyacentes (inmunosupresión, tratamiento previo con antibióticos, insuficiencia renal o hepática, entre otros).

La prescripción de algunos medicamentos está sujeta en muchas ocasiones a factores o circunstancias inherentes al hospedero. Los antibióticos no son la excepción. Es por ello, que el microbiólogo deberá conocer las restricciones que tiene el uso clínico de algunos antibióticos, con el fin de elaborar pruebas de susceptibilidad que proporcionen una valiosa información. A continuación, se muestran algunos de los casos en los que el uso clínico de los antibióticos debe evitarse:

TABLA 5. Circunstancias en las que el uso de algunos antibióticos está contraindicado

Embarazo	Insuficiencia hepática	Insuficiencia renal	Neonato
Cloranfenicol	Cloranfenicol	Cloranfenicol	Cloranfenicol
Colistina	Isoniacida	Ácido nalidíxico	Clindamicina
Dapsona	Piracinamida	Nitrofurantoína	Quinolonas
Nitrofurantoina	Rifampicina	Tetraciclina	Sulfonamidas
Sulfonamidas	Tetraciclinas	Vancomicina	Aztreonam
Tetraciclinas		Aminoglucósidos	Tetraciclinas
Rifampicina			Vancomicina
Metronidazol			
Vancomicina			
Aminoglucósidos*			

* Si se indican, deben vigilarse los niveles séricos.(4)

El reporte de los resultados de una prueba de susceptibilidad bien realizada, es un instrumento que le permitirá al clínico elaborar un plan antibacteriano eficaz contra el

patógeno, seleccionando la droga menos tóxica para el paciente, y con las características farmacocinéticas más apropiadas según la naturaleza y gravedad de la infección.(4)

Fuentes de error más comunes en la realización de un antibiograma

1. Falta del control de calidad de los medios de cultivo a utilizar, patrón de McFarland y los discos de antibióticos.
2. Trabajar con cepas bacterianas que no están puras.
3. Inadecuada estandarización de la concentración del inóculo.
4. Utilización de un número excesivo de discos de antibióticos por placa.
5. Utilización de medios de cultivo no aptos para las pruebas de susceptibilidad.
6. Lectura prematura o extemporánea de las pruebas de susceptibilidad.
7. Medición incorrecta de los halos de inhibición por una iluminación deficiente o reglilla inadecuada.
8. Incubación en atmósfera inadecuada.
9. Error en la transcripción de los resultados en la hoja de reporte.

2 Actividad práctica

El antibiograma

El método utilizado con mayor frecuencia para evaluar la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos es el denominado **prueba de difusión del disco**. Esta técnica fue estandarizada por Kirby y Bauer en 1966, de allí que dicho método también se le conozca con el nombre de “prueba de Kirby-Bauer”. Es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina que sólo brinda información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado. Sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibioticoterapia.(1-3, 7)

Materiales

- Placas con agar Mueller Hinton
- Solución salina estéril
- Patrón 0.5 del estándar de McFarland
- Pinzas
- Asa de platino
- Discos de antibióticos
- Regla milimetrada
- Tablas de los criterios estandarizados del CLSI.
- Hisopos estériles

Procedimiento

1. **Cepa bacteriana a estudiar:** Debe provenir de un cultivo fresco, preferiblemente de un cultivo en agar, de manera que podamos comprobar la pureza de la cepa.
2. **Inóculo:** Se transferirán una o dos colonias del cultivo a un tubo que contenga solución fisiológica estéril. En el caso de bacterias exigentes (Ej: especies de *Haemophilus*, especies de *Streptococcus*, etc.), las colonias se transferirán a un tubo que contenga caldo Mueller Hinton. En cualquiera de los casos, el crecimiento bacteriano se ajustará a la turbidez del patrón 0.5 del estándar de McFarland.
3. Se introducirá un hisopo de algodón estéril dentro del tubo que contiene el inóculo estandarizado en el paso anterior. El exceso de líquido se eliminará haciendo rotar suavemente el hisopo contra las paredes del tubo.
4. Con el hisopo debidamente humedecido, se inoculará en tres o cuatro direcciones toda la superficie de una placa con agar Mueller Hinton, girando sucesivamente dicha placa en ángulos de 90°. Se deja secar el inóculo a temperatura ambiente durante algunos minutos (no más de 20 minutos).

Nota: El agar Mueller Hinton se suplementará con 5% de sangre de carnero en los casos que se esté estudiando la sensibilidad en especies de *Streptococcus* o *Corynebacterium*. En cepas de *Neisseria* y *Haemophilus* se tendrán en cuenta las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

Nunca utilice agar sangre, agar chocolate, agar tripticasa soya, agar nutriente, agar Luria Bertani, BHI entre otros, para la realización de antibiogramas convencionales.

5. Se colocarán con una pinza estéril hasta un máximo de 6 discos de antibióticos en forma equidistantes, presionándolos suavemente contra la superficie de agar.
6. Se colocarán las placas a 36 °C, en atmósfera aeróbica durante toda la noche.
7. **Lectura:** Se realizará después de 18 horas de incubación. Con una regla milimétrica, se medirá la zona clara alrededor del disco de antibiótico, el cual se corresponde con la inhibición del crecimiento bacteriano. Estos datos se compararán con los diámetros de zona establecidos para cada antibiótico en las tablas de interpretación internacional. (6) La interpretación de los halos de inhibición nos permitirán expresar los resultados como *sensible*, sensibilidad *intermedia* o *resistente*. Estas categorías indican lo siguiente:
 - **Sensible (S):** la infección debida al microorganismo aislado puede ser tratada apropiadamente con el antibiótico a la dosis recomendada, de acuerdo a la gravedad de la infección. Sin embargo, para la prescripción definitiva del medicamento, el

médico tratante tendrá en cuenta algunos factores tales como biodisponibilidad del antibiótico en el tejido o sistema afectado, presentación del medicamento, edad del paciente, condiciones patológicas subyacentes o fisiológicas, entre otras.

- **Intermedia (I):** indica que el antibiótico tiene aplicabilidad clínica en sitios corporales donde el antibiótico alcance concentraciones terapéuticas adecuadas, como es el caso de β -lactámicos y quinolonas en el tracto urinario. En otros casos, puede utilizarse el medicamento con seguridad en dosis elevadas que no alcancen los niveles de toxicidad pero que garanticen actividad terapéutica. Sin embargo, es recomendable evitar el uso de la categoría “intermedia” cuando sea posible.
 - **Resistente (R):** la bacteria aislada no es inhibida por el antibiótico a las concentraciones terapéuticas ideales o la bacteria ha generado mecanismos de resistencia que evaden la actividad del antibiótico, por lo tanto, la eficacia clínica de éste no es confiable. Es recomendable que ante el aislamiento de un microorganismo multirresistente clínicamente significativo se ensayen otras pruebas de susceptibilidad adicionales (CIM), tal es el caso de cepas de *Staphylococcus* resistentes a la vancomicina.
8. El reporte de los resultados del antibiograma debe ser realizado en forma clara y precisa y enviados en forma inmediata al médico tratante.

Utilice la siguiente tabla para registrar los resultados obtenidos en el antibiograma:

Microorganismo aislado: _____

Disco de antibiótico	Diámetro en milímetros	Interpretación

Observaciones: _____

Autoevaluación

1. De acuerdo a los datos suministrados por el profesor y los registrados en la tabla anterior, elabore el reporte del antibiograma:

2. ¿Cuál es la finalidad de las pruebas de susceptibilidad?
3. ¿Que significa sensibilidad y resistencia cuando se interpreta un antibiograma?
4. ¿En que casos, las pruebas de susceptibilidad requerirán de medios de cultivos distintos al de Mueller Hinton?

Bibliografía

- (1) Baquero E. El antibiograma: bases microbiológicas para su interpretación. [serie en línea] disponible en <http://www.OCENETmedicinaysalud.com>. Código de documento: 1015491.
- (2) Cona E. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev Chil Infect* 2002; 19 (Supl.2): S77-81.
- (3) García JA, Cantón R, García JE, Gómez-Lus ML, Martínez L, Rodríguez-Avial C, Vila J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos 2000. [serie en línea] disponible en <http://www.seimc.org/protocolos/cap11.htm#A>.
- (4) Linares N.C., Devoto F.M., Estrín M.A., Serra H.A., Tessler J. *Quimioantibioticoterapia*. 2ª ed. Argentina: Editor Luis María Zieher; 2002.
- (5) Martínez-Martínez L. El futuro de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21 (supl. 2): 64-71.
- (6) Clinical Laboratory Standards Institute CLSI (formerly National Committee Laboratory Standards NCCLS). M2-A5 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard. NCCLS, Wayne. 17 (17), 2007.

práctica 3

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior

Kiralba Sánchez

Objetivo general

Desarrollar la estrategia metodológica para el diagnóstico microbiológico de infecciones del tracto respiratorio superior

Objetivos específicos

1. Reconocer los microorganismos de la flora habitual y los principales patógenos del tracto respiratorio superior.
2. Esquematizar los pasos para la obtención y procesamiento de muestras del tracto respiratorio superior.
3. Obtener y procesar muestras de exudado faríngeo y secreción nasal.
4. Identificar los patógenos implicados en procesos infecciosos del tracto respiratorio superior.
5. Detectar la presencia de eosinófilos en moco nasal.
6. Registrar y reportar los resultados.

Aspectos teóricos

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 a través de la trompa de Eustaquio, sin embargo, los procesos infecciosos de oído medio serán considerados en un capítulo separado.(1)

Diversos mecanismos no específicos protegen el tracto respiratorio de las infecciones, entre ellos, se señalan: los pelos, pasaje contorneado, 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 con 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 (Tabla 6). (2)

Las infecciones de vías respiratorias superiores (ITRS) 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.(2)

Tabla 6. Flora habitual y patógenos respiratorios		
Microbiota habitual	Posibles patógenos respiratorios	Patógenos definitivos
Estreptococos del grupo viridans	Estreptococos beta-hemolíticos	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Estafilococos coagulasa negativo	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
Micrococcos	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Neisseria</i> sp. (no patógenas)	Neiserias patógenas	
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Moraxella catarrhalis</i>	
<i>Veillonella</i> sp.	Enterobacterias	
Espiroquetas	<i>Fusobacterium</i> sp.	
	<i>Bacteroides</i> sp.	
	<i>Actinomyces</i> sp.	

Tomado de: Koneman y col., 2001; Murray y col., 2002.

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.(3)
- **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 y la

formación de aftas o placas blanquecinas con base erosionada son compatibles con candidosis faríngea.(3)

- **Sinusitis:** Posterior a una infección nasofaríngea, por contigüidad puede afectarse una o mas 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.(1)
- **Epiglotitis:** es una inflamación difusa de la epiglotis y de las estructuras adyacentes, de progresión rápida; en niños la obstrucción es brusca, completa y fulminante de la vía aérea (en un lapso de 30 min.), se acompaña de disnea y cianosis que pone en riesgo la vida del paciente. La epiglotis se visualiza edematosa y de color rojo cereza.(1)

Otras manifestaciones menos frecuentes incluyen la formación de pseudomembranas, constituidas por tejido necrótico, células inflamatorias y bacterias. Estas formaciones pueden orientar el diagnóstico de la difteria faríngea o hacia una Angina de Vincent.(3)

Etiología de las infecciones del tracto respiratorio superior

El 80% de las ITRS son de etiología viral. El resfriado común es causado principalmente por el grupo de los rinovirus y coronavirus.

La faringitis aguda en su gran mayoría es causada por rinovirus, adenovirus, parainfluenza y coxsackie. La causa bacteriana más frecuente de faringoamigdalitis y, por lo tanto, susceptible de ser tratada con antimicrobianos es *Streptococcus pyogenes*, responsable de 15 a 30% de las faringitis agudas en niños y de 5 a 10% en adultos.(1)

En la tabla 7 se señalan otras bacterias causantes de faringitis, entre éstas tenemos a los Estreptococos beta-hemolíticos de los grupos C y G que se han asociado a brotes epidémicos de faringitis transmitidas por alimentos, a faringitis endémica en comunidades cerradas donde concurren jóvenes y adultos.(4)

Otros agentes etiológicos poco frecuentes lo constituyen: *Arcanobacterium haemolyticum*, *Yersinia enterocolitica*, *Franciscella tularensis* y *Neisseria gonorrhoeae*, esta última debe ser considerada entre los jóvenes y adultos como consecuencia del contacto buco-genital.(1) Existen microorganismos que forman parte de la microbiota habitual de la faringe, algunos participan en la etiología de infecciones del tracto respiratorio bajo, sin embargo, no se consideran patógenos en faringoamigdalitis aguda en pacientes inmunocompetentes; es el caso de *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* y *S. aureus*. *H. influenzae* es un agente causal de faringitis en niños.(1)

En pacientes inmunocomprometidos, se debe informar el hallazgo de *Candida* sp., bacilos gramnegativos y *S. aureus*.(1)

Tanto en la sinusitis como en otitis media, entre los microorganismos etiológicos

frecuentemente implicados se señala a: *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y, en menor proporción *M. catarrhalis*.(1)

La Angina de Vincent es producida por una mezcla de bacterias anaeróbicas y espiroquetas. Estos cuadros son muy raros y se producen en adultos jóvenes.(4)

TABLA 7. Principales causas infecciosas del tracto respiratorio superior

Diagnóstico clínico	Etiología	
	Virus	Bacterias y hongos
Rinitis	Virus Coxsackie A, virus parainfluenza e influenza, virus sincitial respiratorio, rinovirus, adenovirus, coronavirus	Raros
Faringitis o amigdalitis	Virus Coxsackie A ó B, virus parainfluenza e influenza, Herpes simple, adenovirus, rinovirus, Epstein-Barr	<i>Streptococcus pyogenes</i> Estreptococos beta hemolíticos grupos B,C,G, <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>
Sinusitis	Raros	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> Bacterias anaeróbicas
Pseudomembranas faríngeas	Ninguno	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> y <i>Borrelia vincenti</i>
Epiglotitis	Ninguno	<i>Haemophilus influenzae</i> serotipo b
Estomatitis	Virus Coxsackie A, Herpes simple	Especies de <i>Candida</i> <i>Fusobacterium</i> sp, espiroquetas
Abscesos periamigdalino o retrofaríngeo	Ninguno	<i>Streptococcus pyogenes</i> Anaerobios bucales como <i>Fusobacterium</i> sp. <i>Staphylococcus aureus</i> .
Tosferina o coqueluche		<i>Bordetella pertussis</i>

Tomado de: Ryan y Ray, 2004; Braun, 2003.

Diagnóstico

El objetivo primordial del diagnóstico de los ITRS consiste en distinguir los casos de etiología viral (80-90% de los casos) de los producidos por bacterias para los que se dispone de tratamiento. La investigación de agentes virales involucrados en ITRS no se practica de rutina, debido a los altos costos y como no son susceptibles de tratamiento no se justifica su diagnóstico, el cual se reserva para la investigación de brotes epidémicos.(5)

En la tabla 8 se presentan las muestras útiles para el diagnóstico de los diferentes cuadros respiratorios.

TABLA 8. Muestras clínicas y consideraciones para el cultivo según el cuadro clínico		
Cuadro clínico	Muestra a cultivar	Indicaciones para el cultivo
Rinitis	Exudado nasal	Recomendado para la búsqueda de <i>S. aureus</i> y para el diagnóstico diferencial de una rinitis alérgica.
	Hisopado nasofaríngeo	Investigación de virus
Faringitis	Exudado faríngeo	Principalmente se justifica en pacientes sintomáticos para la búsqueda de <i>S. pyogenes</i> . Algunas excepciones de esta conducta se relacionan con las condiciones del hospedero como inmunosupresión, hospitalización, antecedentes de intercurso buco-genital.
Sinusitis	Secreción obtenida por punción de senos paranasales	Indicado en pacientes inmunocomprometidos, en infecciones nosocomiales, mala respuesta antimicrobiana y en casos de complicaciones como: meningitis, osteomielitis, celulitis periorbitaria.
Epiglotitis	Sangre	Se recomienda la toma de hemocultivos seriados (3 muestras) Está contraindicada la toma de muestras faríngeas o nasofaríngeas.
Difteria y Angina de Vincent	Exudado faríngeo Raspado de pseudomembrana	Se cultivarán si existe las características clínicas y epidemiológicas que orienten a su investigación
Tosferina	Hisopado nasofaríngeo	Son muy raros los casos, por lo tanto, no se practica de rutina su investigación, salvo solicitud clínica.

Tomado de: Braun, 2003; Koneman y col., 2001.

Etapa pre-analítica

Los antecedentes del paciente y los factores epidemiológicos son útiles para orientar el diagnóstico etiológico. Entre éstos se deben considerar los datos filiatorios: nombre, edad, ocupación, residencia; la evolución clínica del proceso (ver manifestaciones clínicas), estado inmunológico del paciente, procedencia (hospitalización o de la comunidad), condiciones socio-económicas, estilo de vida, exposición reciente a caso clínico de ITR, tratamientos previos con antimicrobianos, entre otros.(5)

Etapa analítica

La validez de los resultados del diagnóstico microbiológico depende entre otros factores, de que se sigan correctamente las normas de obtención y transporte de la muestra y que la solicitud del estudio, sea acompañada de un breve informe con los datos clínicos y epidemiológicos, que orienten al bioanalista en la selección de las técnicas más adecuadas, según el microorganismo que se vaya a investigar.

Tanto la obtención como el transporte de las muestras al laboratorio constituyen un punto clave para conseguir un resultado satisfactorio.

I. Obtención y procesamiento de exudado nasal

Condiciones previas del paciente:

- No debe estar recibiendo antibióticos, ni antiinflamatorios, ni antialérgicos.

Procedimiento:

1. Elevar la punta de la nariz con el dedo pulgar.
2. En caso de ausencia de secreción, humedecer la punta del hisopo en solución salina estéril e introducirlo hasta la base de la fosa nasal, donde se rota suavemente.
3. Retirar el hisopo con cuidado de evitar la contaminación del mismo con las bacterias de la piel, proceder a realizar los extendidos finos sobre láminas portaobjetos nuevas y limpias para teñir con Gram y Hansel.
4. Proceder de igual forma con un segundo hisopado para la siembra en medios de cultivo: agar sangre (AS) y agar manitol salado (AMS) (Fig. 4).

5. Incubar los medios de cultivo a 36 °C, en condiciones de aerobiosis por 18 a 24 horas.

Observación: Para la obtención de secreción nasofaríngea, se sugiere utilizar hisopos flexibles de alginato de calcio. Esta muestra es útil para la detección de portadores de patógenos como: *N. meningitidis*, *C. diphtheriae* y *B. pertussis*.(5)

Interpretación del examen directo:

- *Gram*: no es útil para el diagnóstico, ya que no es representativo del proceso infeccioso en nasofaringe ni en senos paranasales. Informar la cantidad de leucocitos o células inflamatorias presentes: 1-4xc escaso; 5-10xc moderado; >10xc abundantes.(6)
- *Hansel*: esta coloración es muy útil para la investigación de eosinófilos en moco nasal, la cual permite confirmar el diagnóstico de una rinitis alérgica. Para ello se realiza un recuento diferencial con objetivo de 40X, se cuentan 50 células por campo, si se observan 10 eosinófilos se considera la prueba positiva. Es importante tener presente que la ausencia de eosinófilos no descarta el cuadro alérgico ya que hasta el 70% de los pacientes puede mostrar recuentos menores de eosinófilos o ausencia de éstos, según el momento en que se recolecte la muestra y la severidad de la rinitis.(7)

Revisión de los cultivos para la investigación de portadores nasales de *S. aureus*.

La siembra realizada en los medios de cultivo AS y AMS se revisarán en busca de colonias sugestivas de *S. aureus*, y se procederá a la identificación bioquímica y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer (Anexo 3 y 4).

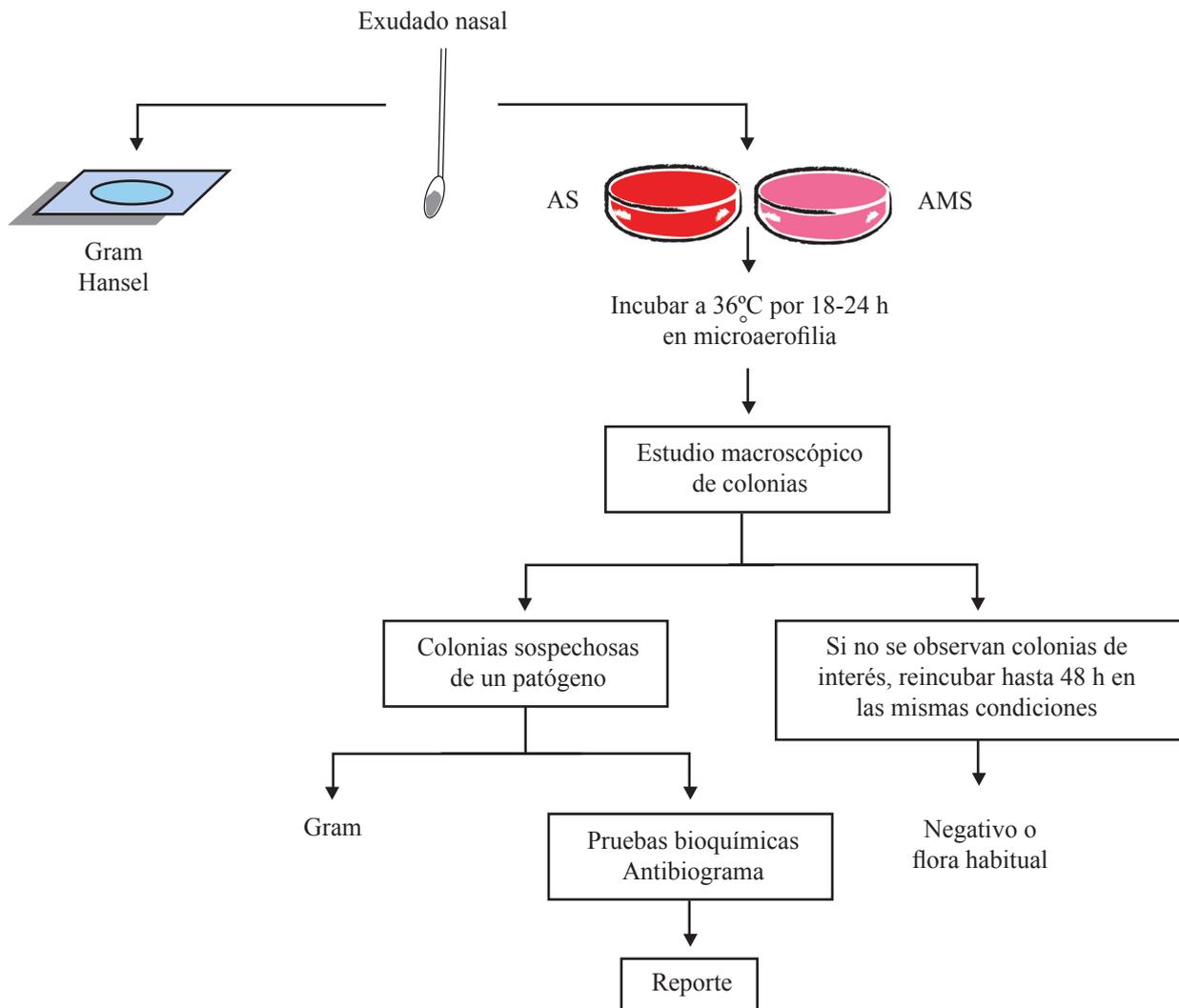


Figura 4. Procedimiento para el cultivo de exudado nasal.

II. Obtención y procesamiento de exudado faríngeo

El cultivo faríngeo es el método estándar para documentar la presencia de *S. pyogenes* en la faringe, esta prueba alcanza una sensibilidad del 90 a 95%.⁽¹⁾

Condiciones previas del paciente

- El paciente no debe haber recibido antibióticos en los últimos 8 días, previos a la obtención de la muestra.
- El paciente debe acudir en ayunas al laboratorio.
- Debe cepillarse los dientes y no practicar gargarismo.

Procedimiento

1. Inspección de la faringe: ubicar al paciente en una posición cómoda y con buena iluminación, deprimir la lengua con el baja lengua, visualizar la fosa amigdalina y faringe en busca de exudado posterior, presencia de pseudomembrana o placas.
2. Indicar al paciente que abra la boca y que pronuncie un largo “ah”, el cual sirve para elevar la úvula y evitar las náuseas.
3. Introducir el hisopo y frotar enérgicamente ambas amígdalas y la pared posterior de la faringe con movimientos de barrido.
4. Retirar el hisopo cuidando de no tocar las paredes laterales de orofaringe, úvula, lengua, encías y dientes.
5. Extender la muestra con suaves movimientos sobre la superficie de los portaobjetos para realizar los frotis que serán teñidos al Gram y con la técnica de Hansel.
6. Obtener un segundo hisopado de fauces para la siembra en AS de carnero, siguiendo la técnica de estriado sobre superficie, realizando siembras de profundidad con el asa para la detección de hemolisinas estreptocócicas (Fig.5).
7. Incubar el AS a 36°C, en condiciones de 5-7% CO₂, por 24-72 horas.

Observación: En caso de ser necesario, la muestra se podrá transportar en medio de Stuart o Amies, realizando el cultivo de la misma en el menor tiempo posible (menos de 2 horas).

Interpretación del examen directo

- *Gram*: describir los hallazgos de células inflamatorias y de alteración de la flora habitual, como es el caso del aumento de bacilos gramnegativos fusiformes y espiroquetales que orientan el diagnóstico hacia una Angina de Vincent; así mismo reportar la presencia de células levaduriformes, hifas y pseudohifas.
- *Hansel*: observación de eosinófilos, permite el diagnóstico diferencial de una faringitis alérgica, muy común en pacientes alérgicos.(7)

Revisión de los cultivos

- Inspeccionar las placas de AS en busca de colonias pequeñas de 1 a 1,5 mm de diámetro, rodeadas de un halo de hemólisis completa (beta-hemólisis).
- A partir de las colonias sugestivas realizar extendidos para teñir al Gram; si se observan cocos grampositivos dispuestos en cadenas, se repican de 4 a 6 colonias en AS y en tubos de caldo Todd-Hewitt e incubar a 36 °C por 24 h.

- Del cultivo en Tood-Hewitt o AS practicar coloración con el método de Gram, para confirmar morfología, reacción y disposición características de los *Streptococcus*.
- Realizar pruebas de identificación (Anexos 3, 7, 8 y 9)

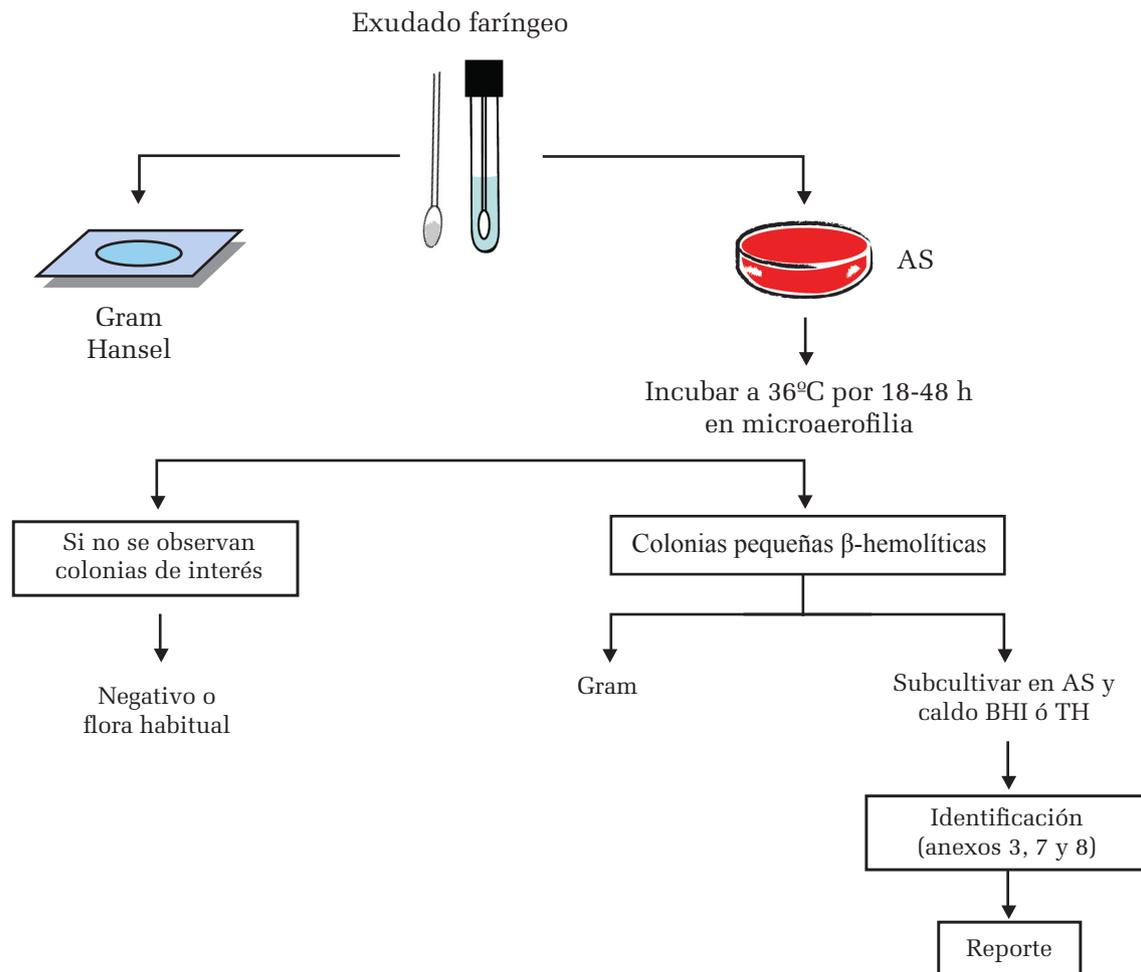


Figura 5. Procedimiento para el cultivo de exudado faríngeo

Para diferenciar *S. pyogenes* de otros beta-hemolíticos, se pueden utilizar diferentes pruebas, siendo la de uso común la prueba de la bacitracina (Anexo 7). Esta prueba se basa en la susceptibilidad de *S. pyogenes* frente a una concentración relativamente baja de bacitracina. Para ello se inocula la cepa pura en AS, mediante hisopo estéril extendiendo en cuatro direcciones; se coloca el taxo A (bacitracina 0,04 U) y el disco de trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) sobre el cultivo. Al cabo de 18-20 h de incubación a 36°C, se detectará la presencia de un halo de inhibición del crecimiento de cualquier tamaño, que indica la susceptibilidad del microorganismo.(7)

Esta técnica tiene un 5% de falsos negativos y entre 10 y 20% de falsos positivos ya que otros *Streptococcus* (grupos C y G) también pueden dar sensibles.(1)

Otra prueba disponible en muchos laboratorios es la hidrólisis del PYR, ésta se fundamenta en la actividad de la enzima pirrolidonil aminopeptidasa producida por *S. pyogenes*, sobre un sustrato el L-pirrolidonil-beta-naftilamida (PYR), con formación de beta-naftilamida libre, que se combina con el reactivo cinamaldehído formando un producto final de color rojo.(6)

Los laboratorios que utilizan las pruebas bacitracina o PYR deben informar: “Hubo desarrollo presuntivo de Streptococcus pyogenes”

La identificación definitiva se lleva a cabo mediante la detección del antígeno específico de grupo, también llamado carbohidrato de Lancefield; ésta se realiza a través de métodos de aglutinación con partículas de látex o coaglutinación, directamente sobre la colonia aislada. Solo los estreptococos beta-hemolíticos, A, B, C, F, G y los alfa o no hemolíticos del grupo D pueden clasificarse con esta prueba. Para su realización se procede a una extracción previa de los antígenos de pared, que dependiendo del método, se empleará: ácido, calor o enzimas. Luego se hace reaccionar la cepa pura de 24 h de desarrollo con cada uno de los antisueros para cada serogrupo. La reacción positiva se evidenciará dependiendo de la interpretación de cada protocolo: ya sea por aglutinación, coaglutinación, entre otros.(6)

Detección directa de *Streptococcus* del grupo del A en hisopado de garganta

Estas pruebas permiten detectar directamente el carbohidrato de la pared de *S. pyogenes*, a partir de un hisopado faríngeo, con la ventaja de obtener resultados inmediatos. La mayoría de las pruebas rápidas tienen excelente especificidad (> 95%) comparado con el cultivo, sin embargo, la sensibilidad alcanza entre 80 y 90%. Por lo que se recomienda que una prueba negativa sea confirmada con el cultivo.(1,2)

Entre los métodos de detección rápida de antígenos se emplean las pruebas de aglutinación con látex y los métodos de enzimo-inmunoanálisis (ELISA), estos últimos con una mayor sensibilidad y especificidad.

Actualmente se ha desarrollado la prueba de inmunoensayo óptico y sondas de ADN quimioluminiscentes. Los datos sugieren que son más sensibles aunque más costosos, por lo cual no están disponibles para uso rutinario.(1)

Las desventajas de estos métodos de detección directa se basan en:

- Solo detectan *Streptococcus* grupo A, no detecta otros serogrupos.
- Bajo valor predictivo positivo, esto es, que no diferencia eficientemente los portadores de un individuo infectado con un reducido número de *S. pyogenes*.
- El elevado costo, sobre todo de los últimos métodos.

Investigación de otros patógenos

1. Búsqueda de *Arcanobacterium haemolyticum*: Se recomienda el uso de AS humana o de caballo para el aislamiento primario a partir de exudado faríngeo. En su defecto se puede utilizar el AS de carnero convencional con incubación hasta por 72 h para lograr evidenciar la beta-hemólisis. Realizar Gram a todas las colonias β -hemolíticas aisladas sospechosas de *S. pyogenes* para hacer diagnóstico diferencial con *A. haemolyticum* que se presenta como un bacilo corto pleomórfico grampositivo.(5) Para su identificación remítase al Anexo 21.
2. Investigación de *Corynebacterium diphtheriae*: Se solicitará cuando exista la sospecha clínica y epidemiológica de un caso de difteria, el cual debe ser orientado por el médico (Anexo 24).
3. Cuando la historia clínica y el examen físico orienten hacia una faringitis por *N. gonorrhoeae*, debe seleccionarse el medio Thayer-Martin, además del AS. Otras especies de *Neisseria* también pueden estar presentes en cultivos de garganta y deben diferenciarse bioquímicamente de *N. gonorrhoeae*, tales como: *N. meningitidis* y las especies no patógenas.(1) Las colonias sospechosas son pequeñas, translúcidas y brillantes, a las cuales se les practicará la tinción al Gram, prueba de la oxidasa y fermentación de azúcares (Anexo 12,13).(5,6)
4. La investigación de *B. pertussis*, se practicará en caso de sospecha clínica de tos ferina. El cultivo se lleva a cabo en medio enriquecido de Bordet-Gengou con el agregado de 10% de sangre de caballo y como agente inhibidor meticilina (2,5ug/mL) o cefalexina (40ug/mL) (Anexo 25).(5,8)

Etapa post-analítica

El informe al médico tratante debe incluir la identificación del paciente, tipo de muestra recolectada, estudio microbiológico realizado, fecha de recepción de la muestra, emisión de los resultados y cualquier otro dato que el bioanalista considere necesario, por ejemplo, las condiciones en que se trasladó la muestra o las características de la misma, hora de llegada al laboratorio, entre otros (Anexo 2).

- En *Examen directo*. Indique la técnica utilizada y describa la morfología, reacción al Gram de los diferentes morfotipos con importancia clínica, tomando en cuenta los aspectos mencionados anteriormente, dependiendo del tipo de muestra y el o los patógenos a investigar. Señalar en forma semicuantitativa la presencia de células inflamatorias.(6)

- En el ítem *Cultivo*: Registre el microorganismo aislado tomando en cuenta su significancia clínica y los aspectos relacionados con el paciente, considerados en el contenido teórico de esta práctica.
- Si están presentes microorganismos indígenas y se ha determinado que son contaminantes para el caso, incluir el siguiente comentario “Desarrollo de microbiota habitual de la región”.
- En el caso de cultivos negativos, indicar “No hubo crecimiento bacteriano en 48 (ó 72) horas de incubación”
- Reporte el *Antibiograma* (en los casos que aplique).
- En *Observaciones*, se debe señalar la lista de microorganismos investigados y otros datos que se consideren de interés para la interpretación clínica del resultado.
- Datos y firma de la persona encargada de la investigación: Nombre y apellido en forma legible. Número de registro ante el Ministerio de Salud y ante el Colegio de Bioanalistas. Firma y sello del laboratorio o institución de adscripción.

3 Actividad práctica

Primer período: Obtención y siembra de secreción nasal y exudado faríngeo

Materiales

- Hisopos estériles
- Bajalenguas estériles
- Láminas porta objetos
- Medios de cultivo: Agar Sangre de carnero (AS) y agar manitol salado (AMS)
- Coloración de Gram
- Coloración de Hansel
- Asa de platino
- Solución salina fisiológica

Procedimiento

1. Elaborar la ficha clínico-epidemiológica del paciente (Anexo 1).
2. Preparar todo el material necesario para la obtención y siembra de las muestras. Rotule las placas, caldo de cultivo y las láminas portaobjeto con el código asignado al paciente.
3. Obtener las muestras de exudado nasal y faríngeo como se explicó previamente. Observe la demostración del docente.
4. Practicar la siembra de las muestras en los medios respectivos: secreción nasal en AS y AMS, el exudado faríngeo en AS (Fig. 4 y 5)
5. Incubar los medios de AS, a 36 °C, en microaerofilia por espacio de 24 a 48 horas. Con revisión periódica cada 24 h y el AMS en aerobiosis.

6. Realizar 2 frotis con cada muestra: uno para teñir con la técnica de Gram y el otro para la coloración de Hansel. Prepare el frotis, aplicando al hisopo movimientos rotativos sobre la lámina portaobjeto, procurando que el extendido quede fino. Deje secar al aire.
7. Fijar los extendidos y siga los pasos para las técnicas de Gram y Hansel. Observar al microscopio.

Coloración de Hansel

- Fije la lámina con metanol absoluto por 3 minutos
- Cubrir la lámina con el colorante durante 1 minuto.
- Agregar agua destilada sobre el colorante por 30 segundos
- Lavar con agua destilada
- Decolorar ligeramente con metanol (dos a tres gotas)
- Dejar secar y examinar el extendido con objetivos de 10X y 40X (no utilice aceite de inmersión)

Segundo período: Revisión de los cultivos

Materiales

- Láminas portaobjeto
- Asa de platino
- Gotero con solución salina fisiológica
- Placas de AS y caldo Todd-Hewitt (TH) o infusión cerebro corazón (BHI)
- Agua oxigenada 3%
- Plasma citratado
- Palillos de madera
- Pipetas Pasteur
- Propipeteador
- Coloración de Gram

Procedimiento

1. Evaluar cada placa de cultivo según las características morfológicas de las colonias, la presencia o no de hemólisis y valorar el desarrollo bacteriano en escaso, moderado o abundante. En el caso de AMS observe si hubo la fermentación del manitol. Registre todas las características observadas.
2. Realizar el análisis microscópico de las colonias de interés microbiológico, según el tipo de muestra. Para ello preparar frotis con las colonias a investigar y teñir con la coloración de Gram. Observar y registrar los resultados.
3. Las colonias de valor diagnóstico deben ser purificadas, en AS y en caldo TH o BHI.

4. A partir del crecimiento en AMS, se procede a la investigación de *S. aureus*, siguiendo el esquema de identificación propuesto (Anexos 3,4).
5. Incubar los medios AS, TH y las pruebas bioquímicas inoculadas.

Tercer período: Identificación bacteriana

Materiales

- Placas de AS
- Placas de Mueller Hinton sin sangre y con 5% sangre de carnero
- Solución salina fisiológica estéril
- Patrón de Mc Farland 0.5
- Viales con discos de antibióticos
- Asa de platino
- Agua oxigenada al 3%
- Palillos de madera
- Láminas portaobjeto
- Taxos de bacitracina
- Coloración de Gram

Procedimiento

1. Revisar y verificar la pureza de los repiques realizados en el período anterior mediante la técnica de Gram.
2. A partir de este repique realizar un inóculo con las colonias sospechosas de *S. pyogenes* sobre un AS fresco. Aplicar un taxo de bacitracina sobre la siembra e incubar en microaerofilia.
3. Realizar la prueba de la catalasa a partir del caldo TH. Registre el resultado.
4. Interpretar las pruebas bioquímicas inoculadas en el período anterior e identificar el microorganismo.
5. Realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana, en el caso que aplique.

Cuarto período: Continuación con la identificación bacteriana

1. Observar la presencia de un halo de inhibición alrededor del taxo de bacitracina. Registre el resultado.
2. Identificar el microorganismo.
3. Dar lectura al antibiograma.
4. Registrar y elaborar el reporte respectivo (Anexo 2).

Autoevaluación

1. ¿Por qué en el cultivo de un exudado faríngeo se debe utilizar sangre de carnero?
2. Clasifique los medios de cultivo empleados en la práctica según su utilidad en el laboratorio.
3. ¿Cuál es la importancia de los portadores nasales de *S. aureus*?
4. Enumere los patógenos respiratorios y los cuadros clínicos que producen.
5. Explique el fundamento de las pruebas: catalasa, coagulasa y PYR.
6. ¿Cuál es la utilidad de la coloración de Hansel en una faringitis?
7. Mencione las pruebas no convencionales para el diagnóstico de una faringitis estreptocócica y discuta sus ventajas y desventajas.

Bibliografía

- (1) Braun S. Estudio microbiológico del tracto respiratorio superior. Rev Chil Infect 2003; 20:193-198.
- (2) Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Microbiología médica. Texto Atlas Color. 4ª ed. España: Mosby Elsevier Science; 2002.
- (3) Ryan K, Ray C. Sherris Microbiología médica. 4ª ed. Mexico: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
- (4) Mandell G, Bennett J, Dolin R. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 5ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 2002.
- (5) Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas Color. 5ª ed. España: Médica Panamericana; 2001.
- (6) Montiel F, Lam M. Manual de microbiología clínica. Chile: Mediterráneo; 2001.
- (7) Reyes M. Rinitis alérgica en niños. Su relación con alérgenos en el ambiente. (serial online) 1996 (citado 17 may 2005). Disponible en: <http://colombiamedica.univalle.edu.co/Vol27no3-4/rinitis.pdf>.
- (8) Universidad Central de Venezuela. Guía de Trabajos prácticos de microbiología. Caracas: FEPUVA-UCV; 2000.

práctica 4

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior

Ana Carolina Ramírez

Objetivo general

Aplicar el procesamiento microbiológico de las diferentes muestras para el diagnóstico etiológico de las infecciones de las vías respiratorias inferiores ocasionadas por bacterias.

Objetivos específicos

1. Mencionar los principales agentes etiológicos causantes de infecciones del tracto respiratorio inferior.
2. Relacionar los datos epidemiológicos y clínicos necesarios para la orientación del diagnóstico microbiológico (etapa pre-analítica).
3. Realizar los diferentes pasos que comprende la etapa analítica del procedimiento para el cultivo de muestras provenientes del tracto respiratorio inferior.
4. Analizar, interpretar y reportar los resultados obtenidos (etapa post-analítica).

Aspectos teóricos

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.(1)

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 esta sección 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.(1)

El tracto respiratorio inferior es un área normalmente estéril, 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. Cuando hay infección a través de las vías respiratorias, muchas veces se observa alguna alteración de los mecanismos de filtrado o eliminación de agentes infecciosos inhalados de las vías respiratorias inferiores.(3,4)

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 bronqueolitis (Fig. 6); estos cuadros se pueden presentar en forma aguda o crónica.(1,2,3)

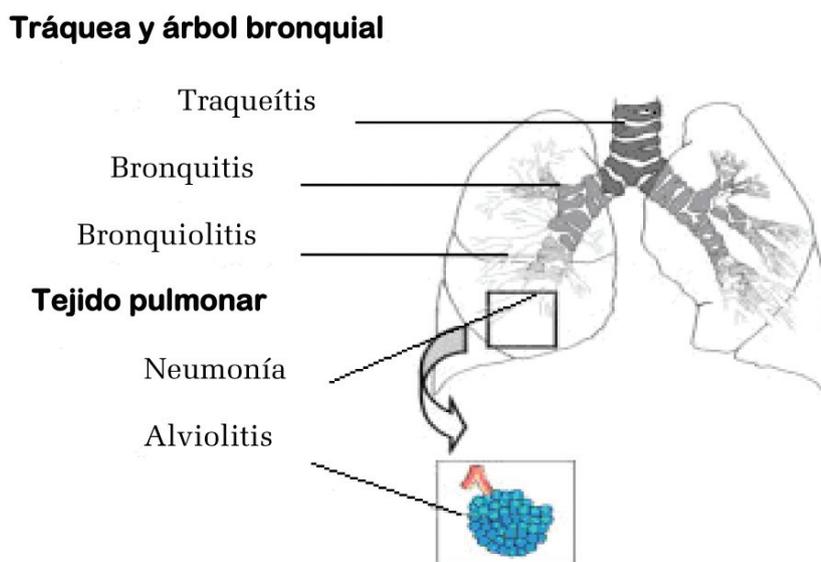


Figura 6. Síndromes que incluyen las infecciones respiratorias bajas
Tomado de: Vía salud, 2001.

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. La bronquitis puede manifestarse como crup (cuadro clínico caracterizado por una tos perruna o ronquera, o ambas).(5)

Las principales causas de bronquitis agudas se mencionan en la tabla 9.

TABLA 9. Principales causas de bronquitis agudas	
Bacterias	Virus
<i>Bordetella pertusis</i> , <i>Bordetella parapertusis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Virus parainfluenza, influenza, sincitial respiratorio (VSR), adenovirus y virus del sarampión

Tomados de: Forbes B. y col, 2004.

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.(2)

Las neumonías pueden ser causadas por una gran variedad de microorganismos: bacterias, virus, micobacterias, hongos y levaduras. En la Tabla 10 se muestran los signos, síntomas y los patógenos aislados en adultos, y en la Tabla 11 se muestran los patógenos aislados en los niños de acuerdo a la edad.

TABLA 10. Etiologías más frecuentes de neumonías en adultos		
Patógenos aislados		
Frecuentes	Poco frecuentes	Raros
Bacterias: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i> • <i>M. pneumoniae</i> • <i>C. pneumoniae</i> • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Coxiella burnetii</i> • <i>Legionella</i> sp • Microorganismos anaerobios de la orofaringe 	
Hongos:		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Coccidioides immitis</i> • <i>Blastomyces dermatitidis</i> • <i>Histoplasma capsulatum</i> • <i>Cryptococcus neoformans</i>
Virus:	<ul style="list-style-type: none"> • Virus Influenza 	<ul style="list-style-type: none"> • VSR • Virus varicela zoster
Parásitos:		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ascaris lumbricoides</i>

Tomado de: Vía salud 2001 [en línea]. Disponible en: <http://www.viasalud.com/documento.asp>

TABLA 11. Etiologías más frecuentes de neumonías en niños de acuerdo a la edad			
Frecuencia	Patógenos aislados		
	< 1 mes	1 mes- 5 años	> 5 años
Frecuentes	Bacterias: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus agalactiae</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. pneumoniae</i> • <i>Chlamydia trachomatis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. pneumoniae</i> • <i>M. pneumoniae</i> • <i>C. trachomatis</i>
	Virus: <ul style="list-style-type: none"> • Virus sincitial respiratorio (VSR) • Virus influenza • Virus parainfluenza 	<ul style="list-style-type: none"> • VSR • Adenovirus 	
Menos frecuentes	Bacterias: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Klebsiella</i> sp. • Otras Enterobacterias • <i>Enterococcus</i> sp. • <i>Staphylococcus aureus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. influenzae</i> • <i>Moraxella catarrhalis</i> • <i>Neisseria meningitidis</i> • <i>M. pneumoniae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Coxiella burnetii</i> • Anaerobios de la microbiota orofaríngea • <i>B. pertusis</i>
Raros	Bacterias:	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ureaplasma urealyticum</i> • <i>Mycoplasma hominis</i> • <i>S. aureus</i> • <i>Streptococcus pyogenes</i> • Enterobacterias • <i>M. tuberculosis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> • <i>S. pyogenes</i> • <i>H. influenzae</i> • <i>N. meningitidis</i> • <i>Legionella</i> sp. • <i>M. tuberculosis</i>
	Virus: <ul style="list-style-type: none"> • Citomegalovirus • Rubéola 		<ul style="list-style-type: none"> • Enterovirus • VSR • Virus parainfluenza

Tomado de: Vía salud 2001 [en línea]. Disponible en: <http://www.viasalud.com/documento.asp?>

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.(2)

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 relaciona-

dos 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.(5)

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.(5)

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.(6,7)

Etapa pre-analítica

a) Datos epidemiológicos: Las infecciones del tracto respiratorio inferior se presentan a cualquier edad, aunque son más frecuentes en niños y ancianos. Están especialmente predisuestas las personas que viven con un bajo nivel socioeconómico y en condiciones de hacinamiento.

Los factores que interfieren con las defensas normales del huésped son alteración de la conciencia, humo de cigarrillo, hipoxemia, acidosis, alcoholismo, inhalaciones tóxicas, edema de pulmón, desnutrición, infecciones virales previas, uremia, obstrucción mecánica y utilización de agentes inmunosupresores (corticoides y drogas citotóxicas). Asimismo, pueden interferir con las defensas normales, enfermedades de base como diabetes, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad cardíaca congestiva y enfermedades inmunosupresoras como el SIDA. Estos datos son fundamentales para orientar al microbiólogo hacia la búsqueda de determinados agentes, (2,4) por ejemplo:

- **Fibrosis quística:** *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae* y en menor medida *Burkholderia cepacia* y otros bacilos gramnegativos.
- **Infecciones virales previas:** *S. aureus*.
- **Contacto con aves:** *Chlamydophila psittaci*.
- **Viajes a áreas endémicas:** *C. immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis*.
- **Riesgo ocupacional y/o contacto con animales:** *C. burnetti*, *Bacillus anthracis*, *Brucella* sp., *Yersinia pestis*.
- **Antecedente de macroaspiración:** anaerobios
- **Epidemias de influenza:** Influenza, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*.

- **Bajo nivel socioeconómico:** *M. tuberculosis*.
 - **Alcoholismo:** *S. pneumoniae*, anaerobios, bacilos gramnegativos.
 - **Pacientes infectados con HIV:** *Pneumocystis carinii*, *M. tuberculosis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*.
 - **EPOC/fumadores:** *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Legionella* sp.
 - **Exposición a murciélagos o materia fecal de los mismos:** *H. capsulatum*.
 - **Exposición a conejos:** *F. tularensi*.(4)
- b) **Datos clínicos del paciente:** signos y síntomas, enfermedades subyacentes y, además, en la orden debe señalarse la impresión diagnóstica del médico tratante.

Etapa analítica

- a) **Tipo de muestras:** esputo o expectoración, aspirado transtraqueal, muestras obtenidas por broncofibroscopia, lavado bronquial, cepillado bronquial, lavado broncoalveolar y biopsia pulmonar. En algunas oportunidades las infecciones pulmonares se acompañan de derrame pleural por lo que es necesario recolectar y estudiar una muestra de líquido pleural obtenida por punción.(7)
- b) **Toma de muestra:** independientemente del método a escoger 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.(6,7,8,9)

El esputo o expectoración en las condiciones habituales de la clínica diaria, no es una muestra representativa de la situación existente en el tracto respiratorio inferior por su mezcla con secreciones procedentes de todo el árbol traqueo-bronquial y con la flora saprófita de la orofaringe. No obstante, es una muestra de fácil obtención cuya utilidad o relación entre resultado obtenido y verdadera etiología depende en gran medida de su correcta obtención, control de calidad antes de iniciar su procesamiento, tipo de agente que se pretenda detectar y valoración adecuada del resultado.(10)

La recolección de esta muestra es sencilla y consiste en solicitar al paciente seguir las siguientes indicaciones:

- Colocar en las paredes exteriores del envase la identificación del paciente (nombre).
- Cepillarse los dientes con agua (no usar pasta de dientes).
- Obtener el esputo tras una expectoración profunda, preferentemente matinal. Para ello, debe inspirar profundamente, reteniendo por un instante el aire de los pulmones y expeliéndolo violentamente por un esfuerzo de tos, 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 que debe ser de boca ancha con tapa de rosca, con capacidad para 30 – 50 mL, transparente porque permite ver la cantidad y la calidad de la muestra y desechable (Fig. 7).
- De no producirse expectoración espontánea, puede inducirse el esputo con nebulizaciones de suero fisiológico 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.(10,11)

Las técnicas de recolección de muestras obtenidas por métodos invasivos no serán objeto de estudio en este capítulo ya que son recolectadas por médicos especialistas y son transportadas al laboratorio para su procesamiento.

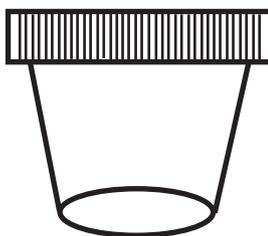


Figura 7. Envase para la recolección de esputo

c) Examen directo de esputo: para la realización del frotis se debe seleccionar la partícula útil de la muestra, constituida por la parte más densa o purulenta. Si hay varias porciones purulentas, se deben mezclar cuidadosamente con los aplicadores y tomar una porción de la mezcla. En caso de observarse solo pequeñas partículas purulentas, escoger tres o más de ellas y mezclarlas en el mismo portaobjeto para homogeneizarlas.(11) A cada muestra se le realiza un extendido para colorear con Gram y otro para Ziehl-Neelsen.

1. Coloración de Gram: se usa para el tamizaje del esputo antes de la realización del cultivo, por lo tanto, esta coloración va a permitir controlar la calidad del esputo, lo cual es importante para evaluar el grado de contaminación con bacterias del tracto respiratorio superior y si la muestra realmente proviene del tracto respiratorio inferior o si se obtuvo de la faringe o por aspiración de secreciones nasales o si es saliva solamente.(11,12)

Uno de los sistemas utilizados es el de Murray y Washington el cual se muestra en la Tabla 12, según este sistema, la observación de gran número de células epiteliales en los grupos 1 al 4 indica contaminación con secreciones orofaríngeas e invalida la muestra. Sólo las muestras del grupo 5 son consideradas clínicamente significativas. Es importante destacar

que el sistema de graduación del esputo no puede ser empleado si se sospecha de infecciones pulmonares causadas por micobacterias, la mayoría de los hongos y virus.(8)

TABLA 12. Sistema de graduación Murray y Washington para el ensayo de calidad de muestra de esputo

Grupo	Células epiteliales por campo bajo de aumento	Leucocitos por campo bajo de aumento
1	25	10
2	25	10-25
3	25	25
4	10-25	25
5	< 10	25

Tomado de Koneman y col., 1999.

2. Coloración de Ziehl-Neelsen: este examen directo se denomina baciloscopía, la cual es una técnica fundamental para la investigación bacteriológica de la tuberculosis, tanto para el diagnóstico como para el control del tratamiento. Esta observación microscópica debe cumplir dos objetivos: a) determinar si en el extendido hay bacilos ácido resistentes (BAR) y b) establecer su número aproximado, esto tiene importancia ya que orienta sobre la eficacia del tratamiento.(11,13)

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 BAR en esputo no es afirmativa de *M. tuberculosis* porque otras micobacterias pueden también 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.(7,13)

La lectura de la baciloscopía debe ser hecha de manera sistemática, leyendo de izquierda a derecha el extendido, tomando en cuenta sólo los campos microscópicos útiles que son aquellos en los que se observan elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células ciliadas); en aquellos campos en que no aparezcan dichos elementos no deben contabilizarse en la lectura.(11)

El número de campos que se deberán observar varía según la cantidad de bacilos que contenga la muestra:

Löwenstein-Jensen, Ogawa Kudoh o Middlebrook 7H10-7H11; dependiendo de la orientación diagnóstica se incluirán medios específicos para hongos dimorfos tales como: agar infusión cerebro-corazón, así como agar infusión de corazón de Sabouraud (SABHI) con sangre de oveja y también Micobiotic o Mycosel, en caso de sospecha de infección por *Legionella* se usa el agar extracto levadura carbón con pH regulado (BCYE) y tinción específica para *P. carinni*.(15, 16)

En la Figura 9 se representa esquemáticamente el procedimiento para el cultivo de la muestra de esputo o expectoración.

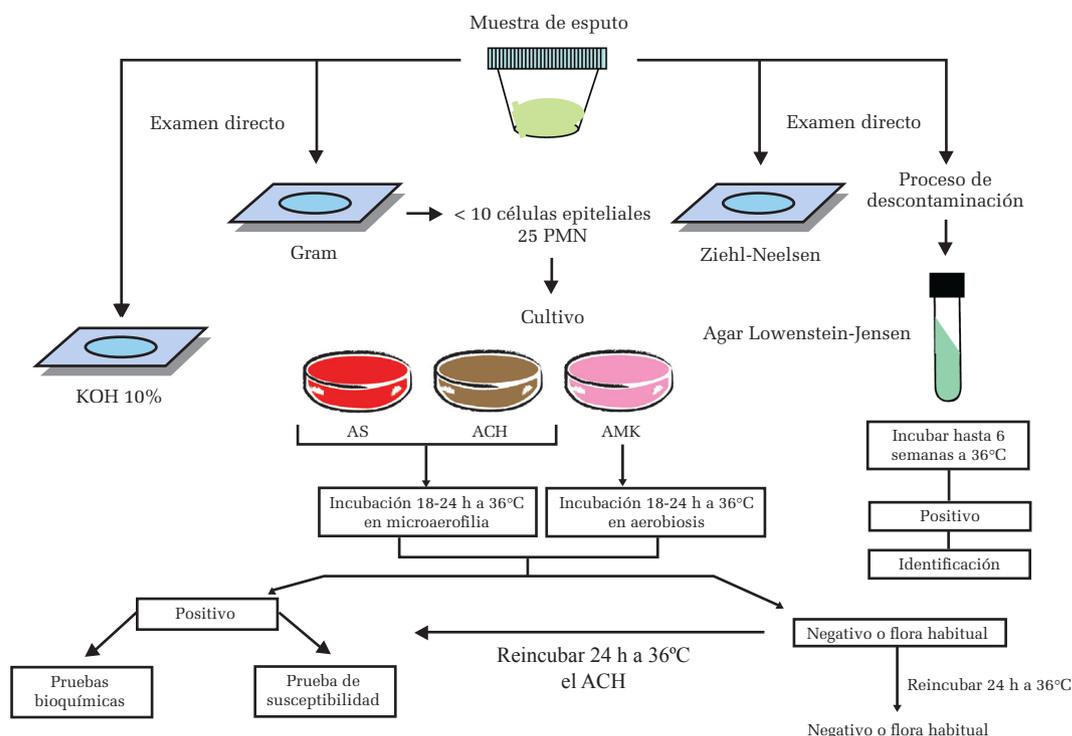


Figura 9. Procedimiento para el cultivo de esputo

Para el aislamiento de micobacterias antes de realizar la siembra en el medio de cultivo se debe realizar un proceso de descontaminación debido a que es necesario eliminar de las muestras los microorganismos contaminantes que interfieren en el desarrollo de estas bacterias. También es importante conseguir la licuefacción de los restos orgánicos (tejidos, moco y otros materiales) que rodean a los microorganismos, para que los agentes descontaminantes puedan destruir las bacterias no deseadas.

Pero si éstas no se utilizan adecuadamente pueden afectar, también la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra y dar lugar a falsos cultivos negativos (por

exceso de descontaminación) o a un número elevado de contaminaciones (por defecto de descontaminación).

Entre los métodos de descontaminación utilizados tenemos de NaOH 4%, Petroff, Tacquet y Ticcson, Kubica modificado por Krasnow y N-acetil-L cisteína-Hidróxido Sódico (NALC-NaOH). La elección de cualquiera de estos métodos dependerá del tipo de muestras que se descontamine y, sobre todo, de la utilización de determinados medios de cultivo y realización de técnicas moleculares a partir del sedimento de las muestras descontaminadas, ya que algunos reactivos utilizados en estos métodos pueden retrasar el crecimiento de las micobacterias o interferir en las reacciones de amplificación.(14)

Todas las muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias se deben sembrar en medios de cultivo adecuados por las siguientes razones:

- 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.(14)

g) Identificación: de acuerdo a la correlación obtenida en el Gram directo de la muestra y el cultivo se procede a la identificación, realizando la selección de las pruebas de acuerdo con la orientación preliminar.

En los anexos 4, 6, 7, 14, 22, 23, 25, 26 y 27 se muestran los esquemas de identificación de algunos los agentes etiológicos que causan infecciones del tracto respiratorio inferior.

Procedimiento para el cultivo de otros tipos de muestras provenientes del tracto respiratorio inferior

a) Examen directo: se realizará la coloración de Gram para el tamizaje de la muestra al igual que el esputo, en el caso de aspirados bronquiales se usan los criterios de Murray y Washington; mientras que en las muestras obtenidas por métodos broncoscópicas la presencia de más del 1% de células escamosas significa contaminación orofaríngea significativa. Además, estos especímenes no deben mostrar menos de un 10% de neutrófilos.(14)

b) Cultivo: se utilizan los mismos medios primarios que para esputo. Para estos tipos de muestras se recomienda cultivos cuantitativos que son imprescindibles para poder comprender el significado del o de los patógeno/s aislado/s.(14)

- **Catéter telescopado:** El volumen de secreciones respiratorias que se recoge con este dispositivo es de aproximadamente 0,01 a 0,001 mL. Después de obtener la muestra, el cepillo se coloca en 1 mL de suero fisiológico estéril, consiguiéndose de esta forma una solución de secreciones respiratorias diluidas entre 100 y 1.000 veces. Posteriormente, se realizará un cultivo cuantitativo de esta solución. Cuando la neumonía es clínicamente manifiesta, habitualmente las secreciones respiratorias contienen al menos 10^4 UFC por gramo de tejido y 10^5 o más bacterias por mililitro de exudado.(14)
- **Lavado broncoalveolar (LBA):** en este caso, el volumen de secreciones respiratorias recuperadas se estima en algo más de 1 mL diluido en el líquido que se aspira (entre 10 y 100 mL), lo que viene a suponer un factor de dilución de 1/10-1/100 de las secreciones respiratorias originales. Los puntos de corte han variado entre 10^3 y 10^5 UFC/mL. No obstante, el umbral diagnóstico generalmente aceptado es el de 10^4 UFC/mL de al menos uno de los microorganismos aislados en el cultivo.(14)
- **Técnicas ciegas:** en el caso del aspirado bronquial ciego y mini lavado broncoalveolar se han considerado como significativas concentraciones entre 10^3 y 10^4 UFC/mL. Para el catéter telescopado no broncoscópico se acepta el mismo punto de corte que para el procedimiento guiado.(14)
- **Aspirado endotraqueal:** El umbral diagnóstico mayoritariamente aceptado es de 10^6 UFC/mL. Algunos autores han recomendado un valor de 10^5 UFC/mL como mejor punto de corte para esta muestra.(14)

Factores a considerar en la interpretación de los cultivos cuantitativos de muestras respiratorias

A pesar de establecer estos umbrales diagnósticos para cada una de las muestras respiratorias, la carga bacteriana debe interpretarse en el contexto clínico específico de cada paciente. No obstante, el análisis de los recuentos bacterianos requiere tener en cuenta la existencia de factores que puedan influir en la concentración de microorganismos en las muestras respiratorias:

1. **Tiempo de evolución de la infección:** Un recuento bajo de microorganismos puede representar un estadio evolutivo precoz de la infección respiratoria.
2. **Antibioterapia previa:** La exposición previa a antibióticos es la variable más importante y la que más a menudo reduce la concentración bacteriana en las muestras

respiratorias, particularmente en pacientes que han iniciado un tratamiento anti-biótico en las 24 horas previas a la recogida de muestras.

3. Existen subgrupos de pacientes con recuentos bacterianos relativamente altos pero sin los cambios inflamatorios que definen la existencia de una neumonía, como ocurre con frecuencia en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
4. Variabilidad de las técnicas: Aunque la reproducibilidad cualitativa es alta, se puede observar una variabilidad en el recuento bacteriano que supone un cambio en la categoría diagnóstica (por encima o por debajo del punto de corte) de un 25-30%, tanto en LBA como en catéter telescopado.
5. Factor dilucional: Cambios en el volumen en el que se introduce el cepillo del catéter telescopado (universalmente admitido de 1 mL) pueden producir variaciones dilucionales de la muestra respiratoria recogida e influir en el recuento de colonias. En el caso del LBA el problema es mayor debido a la falta de estandarización de la técnica, en la que se usan distintos volúmenes según los autores. Se desconoce el efecto del volumen de líquido instilado y del porcentaje recuperado sobre el recuento bacteriano.
6. Otros aspectos técnicos: Errores en la toma de muestras o retrasos en el envío de las mismas al laboratorio de microbiología pueden ser causa de descensos significativos en los recuentos bacterianos o de sobrecrecimientos inespecíficos.(15)

Etapa post-analítica

Una vez realizado el análisis e interpretación de los resultados, se procede al reporte de los mismos:

a) Baciloscopía:

(-): No se encuentran BAR en 100 campos observados.

(+): Menos de 1 BAR por campo en 100 campos observados.

(++): 1 a 10 BAR por campo en 50 campos observados

(+++): Más de 10 BAR por campo en 20 campos observados.

En caso de encontrar sólo uno a cuatro bacilos en cien campos observados debe ampliarse la lectura a otros 100 campos utilizando una nueva línea. Al examinar 200 campos y persistir el número de bacilos en 1 a 4, realizar un nuevo extendido y si persiste el número de bacilos, reportar el número de bacilos observados y solicitar otra muestra. (11,12)

b) Cultivo: se realiza el reporte como se señala en el anexo 2.

4 **Actividad práctica**

Materiales

- Guantes
- Tapaboca
- Aplicadores de madera
- Láminas portaobjetos
- Equipo para coloración de Gram y Ziehl-Neelsen
- Asa en aro
- Placas: agar sangre, agar chocolate y agar Mac Conkey.
- Frasco para microaerofilia
- Reactivos para catalasa y oxidasa.

Procedimiento

Etapas pre-analítica

El estudiante recibirá dos hojas de solicitud de examen con los datos clínicos y epidemiológicos del paciente.

Etapas analítica

Cada grupo de trabajo recibirá un frotis para la realización de baciloscopía y una muestra de esputo, el profesor dará las indicaciones y condiciones de trabajo necesarias para el procesamiento.

Primer período

Espuito

- a) Colocar sobre la mesa de trabajo papel absorbente humedecido con fenol al 5 %.
- b) Realizar los frotis de la siguiente manera:
 - Dividir un aplicador de madera estéril en dos y con los extremos irregulares seleccionar la partícula útil de la muestra.
 - Colocarla sobre la lámina portaobjeto y extenderla con el aplicador hacia el extremo opuesto.
 - Una vez terminado el extendido, desechar los aplicadores en un recipiente con cloro al 2%.
 - Dejar secar al aire y fijar al calor.
- c) A uno de los frotis realizar la coloración de Gram, y al otro, Ziehl-Neelsen.
- d) Sembrar por estría en superficie las placas de AS, ACH y AMK.

- e) Incubar a 36 °C durante 18 – 24 h, las placas de AS y ACH en microaerofilia y AMK en aerobiosis (Fig. 9).

Frotis entregado

- a) Fijar al calor.
- b) Realizar la coloración de Ziehl-Neelsen y dejar secar al aire.
- c) Observar con objetivo de inmersión y realizar la lectura como se explicó en el marco teórico.
- d) Realizar el recuento semicuantitativo y registrar los resultados en la hoja destinada para tal fin.

Segundo período

- a) Evaluar la flora bacteriana.
- b) Practicar análisis microscópicos utilizando la coloración de Gram de las colonias sospechosas de interés clínico.
- c) Seleccionar la(s) colonia(s) de interés y purificarlas en el medio de cultivo utilizado en el aislamiento primario e incubar en las mismas condiciones.
- d) Realizar algunas pruebas preliminares como catalasa, oxidasa, etc., de acuerdo a lo observado en los cultivos y examen microscópico.

Tercer período

- a) Realizar la identificación de el o los microorganismos de interés clínico utilizando los esquemas de identificación (ver anexos) de acuerdo a la orientación.
- b) Realizar el antibiograma por el método de Kirby-Bauer.

Cuarto período

- a) Lectura de las pruebas bioquímicas y pruebas de susceptibilidad.

Etapa post-analítica

Cultivo

- a) Interpretación de las pruebas bioquímicas y antibiograma.
- b) Reporte de los resultados

Frotis

- a) Realizar el reporte del resultado (Anexo 2).

Autoevaluación

1. Señale la utilidad de la coloración de Gram en el procesamiento de una muestra de esputo.
2. Señale tres agentes etiológicos bacterianos más frecuentemente implicados en infecciones del tracto respiratorio inferior.
3. Señale los objetivos de la baciloscopía.
4. Si en una baciloscopía se observan de 1 a 4 bacilos en promedio por campo. Señale la conducta a seguir.
5. ¿Qué conducta se debe seguir si al procesar una muestra de esputo se observan 25 células epiteliales y 10-25 leucocitos por campo de bajo aumento (10X)?
6. ¿Cómo se explica el siguiente resultado: Baciloscopía: Negativa (no se observan BAR en 100 campos observados); Cultivo: Positivo para *M. tuberculosis*?
7. ¿Se puede establecer el diagnóstico etiológico cuando se observan BAR en el examen directo de esputo?
8. Señale la importancia del proceso de decontaminación para el cultivo de micobacterias.
9. Al procesar una muestra de esputo se obtienen los siguientes resultados:
 - Examen directo (Coloración de Gram): 5-10 células epiteliales y 25-30 PMN por campo de bajo aumento. Se observó predominio de cocos grampositivos en pares y cadenas cortas.
 - Coloración de Zielh-Neelsen: No se observaron BAR en 100 campos observados.
 - Cultivo: colonias pequeñas, circulares, transparentes, brillantes, α -hemolíticas hasta el tercer cuadrante.
 - Catalasa negativa, LAP negativa y al Gram se observa la misma morfología observada en el examen directo.
 - a) Señale las pruebas que se le realizarían para hacer la identificación definitiva del microorganismo.
 - b) ¿Qué valor diagnóstico Ud. le daría a los hallazgos obtenidos?

Bibliografía

- (1) Mims C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Willians R. Microbiología médica 2ª ed. España: Harcourt Brace; 1999.
- (2) Vía salud [en línea] 2001 [fecha de acceso 18 de Abril de 2005]; URL disponible en: <http://www.viasalud.com/documento.asp?>
- (3) Ryan K, Ray G. Sherris. Microbiología médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
- (4) Lopardo H, Hernández C, Soloaga R. Diagnóstico microbiológico de las Infecciones Respiratorias Bacterianas [en línea] 1999 [fecha de acceso 18 de Abril de 2005]; URL disponible en www.ifcc.org/ria/div/britanis/az_19.htm
- (5) Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scout diagnóstico microbiológico. 11ª ed. Argentina: Editorial Panamericana; 2004.
- (6) Jiménez P, Calvo M. Diagnóstico microbiológico en neumonía comunitaria [en línea] 2005 [fecha de acceso 18 de abril de 2005]; URL disponible en: www.scielo.ch/
- (7) Vizcaya L. En: Araque M, Nieves B, Sánchez K, Velásquez A, Velazco E, Vizcaya L. Manual práctico de bacteriología. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia, Escuela de Bioanálisis, Departamento de Microbiología y Parasitología, Cátedra de Bacteriología Clínica. 1.999.
- (8) Koneman E, Allen S, Jandon W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color. 5ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 1999.
- (9) Ballows A, Hausler W, Herrmann K, Isenberg H, Shadomy H. Manual of clinical Microbiology. 5ª ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1991.
- (10) Pinzón J. (Ed). Recogida, transporte y conservación de las muestras. Protocolos de Sociedad Española de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica [en línea] 1993 [fecha de acceso 10 de Abril de 2005] URL disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/cap1.htm>
- (11) Ministerio de Salud y Desarrollo Social. División de tuberculosis y enfermedades pulmonares. Laboratorio de Referencia Nacional de Bacteriología de la Tuberculosis.
- (12) Armengol R, Guilarte A. Norma oficial venezolana del programa nacional integrado de control de la tuberculosis. Caracas: Ministerio de Salud y Desarrollo Social; 1998.
- (13) Programa continuo de actualización en el laboratorio. Examen de esputo [en línea] 2005 [fecha de acceso 15 de Abril de 2005] URL disponible en: <http://www.mamut.com/tecmed>
- (14) Casal M., Guerrero A., Martín N., Moreno S., Nogales M. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias [en línea] 1999 [fecha de acceso de Abril 2005]; URL disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/cap9.htm#intro>

- (15) Álvarez, F., Torres A., Rodríguez F. Recomendaciones para el diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica [en línea] 2000 [fecha de acceso 15 de Abril de 2005]; URL disponible en: <http://www.ceimc.org/geih/doc3.htm>
- (16) Finegold S., Baron E. Bailey Scout diagnóstico microbiológico. 7ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 1989.

práctica 5

Diagnóstico microbiológico de las infecciones óticas

Emma Araujo y Aurora Longa

Objetivo general

Aplicar los métodos convencionales para el diagnóstico microbiológico de las infecciones óticas.

Objetivos específicos

1. Describir las condiciones adecuadas para la toma de muestra en los sitios anatómicos relacionados con el cuadro clínico.
2. Analizar macroscópicamente y microscópicamente la muestra en estudio.
3. Cultivar la muestra obtenida para el aislamiento de los agentes patógenos.
4. Valorar el crecimiento obtenido en los distintos medios de cultivo.
5. Identificar los microorganismos de interés clínico.
6. Realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a los agentes etiológicos bacterianos.
7. Analizar los resultados obtenidos.
8. Elaborar el reporte de los resultados.

Aspectos teóricos

La mayor parte de las infecciones del oído afectan el conducto auditivo externo (**otitis externa**) o la cavidad media (**otitis media**) que contiene los huesecillos y está rodeada por otras estructuras óseas y la membrana timpánica. La **otitis** es una enfermedad del oído caracterizada por inflamación de la mucosa del oído externo, medio o interno (mastoides), perforación de la membrana timpánica y otorrea. Esta patología se puede clasificar sobre la base de consideraciones clínicas o histopatológicas. Según su duración se puede subdividir en fase aguda y crónica. La fase aguda se refiere a la infiltración

de polimorfonucleares y a los signos clásicos de inicio brusco y duración breve y la fase crónica se refiere a procesos prolongados y con menos signos inflamatorios.(1)

- **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.(1)
- **Otitis media:** el término de otitis media se refiere a la inflamación del oído medio e incluye no solo a esa cavidad sino también a la trompa de Eustaquio y mastoides. Se produce infiltración por polimorfonucleares y se observan los signos clásicos de inflamación aguda. Según la duración, puede dividirse en aguda y crónica.(2) La trompa de Eustaquio, que comunica el oído medio con la nasofaringe y realiza tres funciones: ventilación, protección y limpieza a través del transporte mucociliar, parece tener una participación importante en la predisposición de los pacientes a este tipo de infección. Las infecciones virales respiratorias superiores o los trastornos alérgicos pueden causar inflamación y edema de la trompa de Eustaquio o su orificio alterando sus funciones, la más importante puede ser la ventilación, cuando ésta se pierde se absorbe oxígeno del aire hacia el oído medio y se genera presión negativa. La presión a su vez permite la entrada de bacterias potencialmente patógenas de la nasofaringe hacia el oído medio y el fracaso de su eliminación normal puede ocasionar colonización e infección. Otros factores que pueden llevar a afecciones de la función de la trompa de Eustaquio son anomalías anatómicas, como hipertrofia tisular o cicatrización alrededor del orificio, disfunción muscular vinculada con paladar hendido y falta de rigidez de la pared de la trompa. Esta última, es frecuente en la lactancia y la niñez temprana, mejora con la edad y puede explicar en parte por qué la otitis media aparece más a menudo en lactantes de seis a 18 meses de edad y después disminuye de frecuencia al establecerse la permeabilidad de la trompa de Eustaquio.(1)
- **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 signos como: membrana timpánica opaca o hiperémica, que puede estar abombada y con poca movilidad a la neumatoscopia y 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. Existen varias entidades nosológicas dentro de la otitis media

aguda y del adecuado reconocimiento de cada una de ellas dependerá el manejo apropiado del paciente.

- **Otitis media serosa:** es la presencia de un trasudado líquido en la cavidad del oído medio en un paciente asintomático (sin datos de infección aguda). Con frecuencia es posible visualizar un trasudado de color ámbar o ligeramente azulado a través de una membrana timpánica translúcida intacta. Sin embargo, el hallazgo más frecuente es una membrana timpánica opaca.
- **Otitis media aguda recurrente:** es la presencia de episodios repetidos de OMA con periodos de completa recuperación (sin secreción) del oído medio entre cada uno de éstos. Para que un niño sea diagnosticado con OMA recurrente debe haber tenido tres o más episodios de OMA en los últimos seis meses, o cuatro durante el último año.
- **Otitis media aguda no complicada:** es la presencia de OMA en un niño sin la presencia simultánea de otras complicaciones tales como bacteremia, mastoiditis, meningitis, sinusitis o absceso cerebral.(3)
- **Otitis media crónica (OMC):** El nombre de otitis crónica se aplica a la infiltración del mucoperiostio por células esféricas, es decir, las de inflamación crónica. Suele ser producto de infección aguda que no se ha resuelto de modo apropiado, ya sea por tratamiento inadecuado en la fase aguda o por factores del huésped que perpetúan el proceso inflamatorio (ej. disfunción continua de la trompa de Eustaquio por factores alérgicos, anatómicos o inmunodeficiencia). Las secuelas incluyen destrucción progresiva de las estructuras del oído medio y riesgo significativo de sordera permanente. La patogénesis de la OMC no es bien conocida. Las causas de la OMC son complejas y varían de un paciente a otro; entre ellas se incluyen defectos del desarrollo, como en el caso de la fisura palatina, movilidad disminuida del extremo faríngeo de la trompa de Eustaquio (adenoides grandes, tumores), infecciones de adenoides o de los senos paranasales con estasis linfática en la trompa, tumefacciones alérgicas de la mucosa tubotimpánica. También se han descrito condiciones anatomofuncionales locales predisponentes como la disfunción tubaria y escasa neumatización mastoidea. Puede ser supurada o no, en el primer caso hace referencia a una infección clínica activa.(1, 2)

Epidemiología

La **otitis media serosa (secretoria)** se reconoce como la patología más frecuente de la edad pediátrica y una de las patologías sobre la que más interés, discusiones y controversias se producen, debido fundamentalmente a las especiales características que la acompañan. La más importante es, sin duda, que usualmente no produce los síntomas que esperamos encontrar en una patología que puede ocasionar complicaciones

tan serias, anatómicas y funcionales, en el paciente que la padece. Es por esto que se le denomina “síndrome silencioso”. Por este motivo gran cantidad de episodios de otitis medias secretorias pasan sin ser diagnosticadas con las consecuentes alteraciones físicas y de desarrollo intelectual como: retraso en la adquisición del lenguaje, retraso escolar y alteraciones del comportamiento.

Todas estas características hacen que la incidencia real de la enfermedad sea desconocida, aunque muchos autores han tratado de establecer porcentajes aproximados.(4)

La OMA es una de las enfermedades que se diagnostican con mayor frecuencia en niños menores de 5 años en todo el mundo. Un reporte mostró que se identifica desde 22,7% de los niños durante el primer año de vida hasta 40% en niños de 4 a 5 años de edad.(3)

La prevalencia de infecciones recurrentes del oído medio parece ir en aumento debido a una asistencia cada vez mayor de niños a guarderías, o a problemas alérgicos. Algunos estudios prospectivos han demostrado que en niños de 3 meses a 3 años de edad con infecciones agudas de vías respiratorias superiores, una tercera parte llegan a complicarse con OMA, y que los niños menores de 2 años que asisten a guarderías tienen episodios de OMA y síntomas de vías respiratorias persistentes con una frecuencia aun mayor.

Otros factores de riesgo conocidos para el desarrollo de OMA temprana en niños son el tabaquismo pasivo, el uso del chupón y la alimentación con biberón en posición horizontal.(3)

En algunos casos hay persistencia de secreción estéril posterior a la resolución de la infección aguda, ésta puede variar entre 1 y 3 meses. Existen factores de riesgo implicados en esta persistencia como: bajo peso al nacer y prematuridad, sexo masculino, condiciones socioeconómicas desfavorables, asistencia a guarderías, polución y tabaco, tipo de lactancia, la edad del primer episodio, factores genéticos e inmunitarios y cambios en la climatología; además, influyen en la aparición, recurrencia y evolución de la enfermedad. Estas múltiples causas van a dar lugar a una disfunción de la trompa de Eustaquio, esta situación es también favorecida por las diferencias entre la trompa infantil y la adulta.(4)

Una de las complicaciones más frecuentes de la OMA es el desarrollo de OM serosa con la consiguiente disminución de la audición. Cuando ésta se prolonga, se acompaña de una afectación potencial en el aprendizaje y en la expresión del lenguaje. Otras menos frecuentes, que si no son reconocidas a tiempo pueden poner en riesgo la vida de los niños, son la mastoiditis y los abscesos intracerebrales. Aunque estudios con controles históricos indican que estas complicaciones supurativas parecían ocurrir con mayor frecuencia en la era preantibiótica, 13 de los casos reportados en la era postantibiótica con frecuencia se asocian a un manejo inapropiado del episodio de OMA.

De acuerdo con una estimación de la Organización Mundial de la Salud en países en vías de desarrollo, el número de muertes asociadas a las complicaciones de la OMA en niños menores de cinco años llega a 50.000 al año. Esto podría estar asociado a un reconocimiento tardío de dichas complicaciones o al efecto de un estado nutricional precario.(3)

Manifestaciones

La **otitis externa** se caracteriza por inflamación del conducto auditivo y drenaje purulento, que puede ser muy doloroso con extensión de la celulitis a los tejidos blandos adyacentes. Una forma frecuente se vincula con la natación en agua tal vez contaminada por microorganismos aerobios gramnegativos como especies de *Pseudomonas*. La **otitis externa “maligna”** es una forma considerablemente más grave de infección del conducto auditivo externo, que puede llevar a la invasión del cartílago y hueso adyacentes y en ocasiones a la parálisis de nervios craneales y la muerte. Se observa con mayor frecuencia en ancianos con diabetes mellitus y en pacientes de cualquier edad con inmunosupresión. El agente patógeno causal más frecuente es *P. aeruginosa*.

La **otitis media aguda**, casi siempre producida por bacterias, suele ser una complicación de las enfermedades virales agudas de las vías respiratorias superiores. Se manifiesta frecuentemente con fiebre, irritabilidad y dolor agudo y el estudio otoscópico revela protrusión de la membrana timpánica, mala movilidad y ocultamiento de los puntos de referencia anatómicos normales por la presencia de líquido y células inflamatorias bajo presión. En algunos casos la membrana timpánica está inflamada de manera aguda y presenta ampollas en su superficie externa (miringitis). Si se trata de forma inadecuada, la infección puede avanzar hasta afectar estructuras adyacentes, como las células aéreas mastoideas (mastoiditis), o causar la perforación con drenaje espontáneo a través de la membrana timpánica. Las posibles secuelas supurativas agudas incluyen extensión hacia el sistema nervioso central y septicemia.

Como ya se había mencionado antes, la **otitis media crónica** suele ser producto de una infección aguda que no se resolvió de modo apropiado.

La otitis media serosa puede representar una forma de otitis media o inflamación relacionada con alergia crónica. Tiende a ser crónica, produce déficit auditivo y se vincula con secreciones espesas en el oído medio que por lo general no son purulentas.¹

Flora habitual del oído externo

La microbiota general del oído externo es similar a la de la piel, predominando *Staphylococcus* (coagulasa-negativo) y miembros del género *Corynebacterium*. Con menos frecuencia se observan especies de *Bacillus*, *Micrococcus* y *Neisseria*. En esta localización se han aislado también otros microorganismos que colonizan la piel en forma transitoria como *Streptococcus pneumoniae*, *P. aeruginosa* y especies de la familia *Enterobacteriaceae*, entre ellos, los géneros *Proteus*, *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Estudios micológicos demuestran que los siguientes géneros de hongos pertenecen a la microbiota normal: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Candida* y *Saccharomyces*.(5,6)

Agentes causales comunes

Desde hace décadas, los patógenos bacterianos asociados a OMA han permanecido sin cambios significativos, en los distintos grupos de edad así como en áreas geográficas (Tabla 13). Después de los primeros tres meses de vida, *S. pneumoniae* es el agente causal más aislado de otitis media aguda y representa 35 a 40% de los casos. *H. influenzae* también es común (14-27%), en particular, en pacientes menores de cinco años de edad. Casi ningún tipo de *H. influenzae* aislado del oído medio se puede identificar; por tanto, no cabría esperar que la vacuna actual contra la cepa de tipo “b” redujera de manera notoria la incidencia de otitis media aguda.

TABLA 13. Agentes etiológicos más frecuentes de infecciones óticas	
Cuadro clínico	Agentes etiológicos
Otitis externa	Es frecuente <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; en ocasiones, especies de <i>Proteus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> ; las bacterias que se encuentran en la otitis media también pueden recuperarse si el proceso es secundario a la infección del oído medio con perforación y drenaje a través de la membrana timpánica; los hongos, como las especies de <i>Aspergillus</i> , participan en ocasiones.
Otitis media aguda < 3 meses de edad	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , Estreptococos del grupo “B”, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> y bacterias entéricas gramnegativas.
> 3 meses de edad	<i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Haemophilus influenzae</i> son los más frecuentes; otros incluyen <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> y <i>S. aureus</i> .
Otitis media crónica	Flora mixta en 40% de los casos con cultivo. Los microorganismos frecuentes incluyen <i>P. aeruginosa</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , especies de <i>Proteus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> y bacterias anaerobias grampositivas y gramnegativas.
Otitis media serosa	Igual que la otitis media crónica; sin embargo, muchos de esos derrames son estériles, con relativamente pocas células inflamatorias agudas.

Tomado de: Ryan y Ray, 2004.

Sin embargo, sólo en el 58 a 75% de los casos se logra aislar alguna bacteria. Estudios realizados para la identificación de agentes virales en el líquido del oído medio de pacientes con OMA han demostrado su presencia en 41% de ellos, pudiendo coexistir hasta tres virus de manera simultánea, que por orden de frecuencia son: Virus sincicial respiratorio, virus parainfluenza e influenza. La coexistencia bacterias-virus en el líquido del oído medio es una causa de otitis media aguda persistente y un retraso de 2 a 4 días en la esterilización del líquido por los antimicrobianos.(1,3)

Diagnóstico

El diagnóstico de las infecciones óticas se establece con base a la exploración clínica. En casos de sospecha de otitis media se puede hacer timpanometría para detectar la presencia de líquido en el oído medio y valorar la función de la membrana timpánica. La causa específica de la otitis externa puede determinarse por cultivo de material obtenido del conducto auditivo afectado; no obstante, debe tenerse en cuenta que la contaminación superficial y la flora cutánea normal pueden originar cultivos mixtos que son origen de confusión. Por ello, es recomendable tomar muestra del material de ambos conductos auditivos.

En la otitis media, el método diagnóstico más preciso es la aspiración cuidadosa con una aguja estéril a través de la membrana timpánica, después de descontaminar el conducto auditivo. La tinción de Gram y el cultivo de tales aspirados son muy confiables; empero, dichos procedimientos se reservan para pacientes en los que las posibles causas son muy variadas, como en lactantes pequeños o cuando existe inadecuada respuesta clínica al tratamiento antimicrobiano usual. No se puede confiar en los cultivos del aparato respiratorio ni en los de nasofaringe para emitir un diagnóstico causal.(1)

Para el análisis de secreción ótica, se debe tomar en cuenta el tipo de otitis que presente el paciente: otitis externa, otitis media serosa con o sin ruptura timpánica. Una vez hecho esto se tomará la muestra dependiendo del caso. Si se trata de una otitis externa se limpia el canal externo con solución salina fisiológica estéril y se introduce un hisopo estéril en el conducto auditivo externo. Los cultivos de canal auditivo externo generalmente no reflejan la causa bacteriana de la otitis media, a menos que haya habido una ruptura reciente de membrana del tímpano.

Con respecto a la secreción ótica de oído medio, ésta es una muestra que debe ser obtenida a través de un procedimiento médico; posterior a la limpieza del canal auditivo externo con un antiséptico suave, se recolecta la muestra mediante aspiración, desde el tímpano o más atrás.(7)

Si las muestras no son tomadas en el laboratorio éstas pueden ser transportadas en frasco estéril o en medio de transporte Stuart, manteniéndose a temperatura ambiente hasta 2 horas luego de la toma.

Para investigar hongos es necesario incluir exámenes en fresco que permitan observar sus estructuras características así como medios de cultivo que permitan su desarrollo y posterior identificación.

Si se requiere la realización de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana tener en cuenta la elección del agar Mueller Hinton (Mueller Hinton básico, Mueller Hinton con 5% de sangre y Mueller Hinton con 2% de cloruro de sodio) dependiendo del microorganismo identificado.

Tratamiento

Excepto en casos graves, la otitis externa puede tratarse mediante limpieza suave con soluciones tópicas. Las bacterias gramnegativas más a menudo referidas son susceptibles a un ambiente ácido y suelen ser eficaces las soluciones óticas amortiguadas a un pH bajo (3.0 o menos), como aquellas con ácido acético al 0,25%. Se dispone de varios preparados, de los cuales un gran porcentaje de los mismos también contienen antimicrobianos.

La otitis media aguda requiere de antimicrobianos y vigilancia cuidadosa de la evolución para asegurar su resolución. La selección del antimicrobiano suele ser empírica, ideada de forma específica para cubrir a los patógenos bacterianos más frecuentes, porque la aspiración directa para fines diagnósticos casi nunca es necesaria. En el caso habitual, esos microorganismos patógenos son *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Si hay presión extrema con dolor intenso, tal vez sea necesario el drenaje de los exudados del oído medio mediante incisión cuidadosa de la membrana timpánica. En pacientes con otitis media serosa o crónica, el tratamiento tal vez sea más complejo y suele aconsejarse buscar interconsulta otorrinolaringológica para determinar procedimientos diagnósticos adicionales, así como planear posibles medidas terapéuticas médicas y quirúrgicas.(1)

5 Actividad práctica

Etapa pre-analítica

Aspectos a considerar del paciente

- Se debe tomar en cuenta tipo de otitis que presenta.
- Nombre, edad, sexo, cédula de identidad, ocupación, procedencia
- Signos y síntomas, impresión diagnóstica
- Historia clínica del paciente
- Si está recibiendo o recibió algún tipo de tratamiento

Aspectos a considerar de la muestra

- Si el laboratorio está en capacidad de tomar y procesar la muestra para el examen requerido.
- Si la muestra no fue tomada en el laboratorio se debe tener en cuenta: si viene bien rotulada, transportada de forma adecuada, tiempo de toma de la muestra, si es apta para el tipo de análisis a realizar, si está en suficiente cantidad.

Etapa analítica

Primer período

Materiales

- Hisopos estériles
- Solución salina fisiológica estéril (SSF)
- Medios de cultivo: agar sangre, agar chocolate suplementado, agar Mac-Conkey y agar manitol salado.
- Equipos para tinción de Gram
- Láminas y laminillas
- KOH al 10%
- En caso de haber observado estructuras fúngicas: Agar saboraud dextrosa con y sin antibióticos, agar actidione, bilis-agar.
- En caso de que la muestra sea tomada a distancia del laboratorio debe transportarse en el medio Stuart.

Procedimiento

Toma de muestra del conducto auditivo externo:

1. Limpiar el canal auditivo externo con un hisopo impregnado con SSF.
2. Humedecer varios hisopos estériles con solución salina igualmente estéril y tomar la muestra del conducto auditivo externo de cada oído. Introducir el hisopo siguiendo una dirección oblicua de atrás hacia delante y de abajo hacia arriba. Obtener la muestra del margen activo, incluyendo la secreción fresca de áreas profundas.
3. Realizar un examen directo y colorearlo con la tinción de Gram con muestra proveniente de cada oído, los hisopos se descartan una vez utilizados.
4. Preparar exámenes en fresco con SSF y KOH si se sospecha de hongos.

Describe lo observado:

Gram de oído derecho

Gram de oído izquierdo

SSF	KOH 10%

- Sembrar la muestra de cada oído por separado en una misma placa. Hacer este procedimiento con cada uno de los agares (Fig. 10).
- Diseminar e incubar bajo condiciones de microaerofilia a 37 °C por 24-72 horas los medios de agar sangre y agar chocolate suplementado y en aerobiosis el agar MacConkey y el agar manitol salado

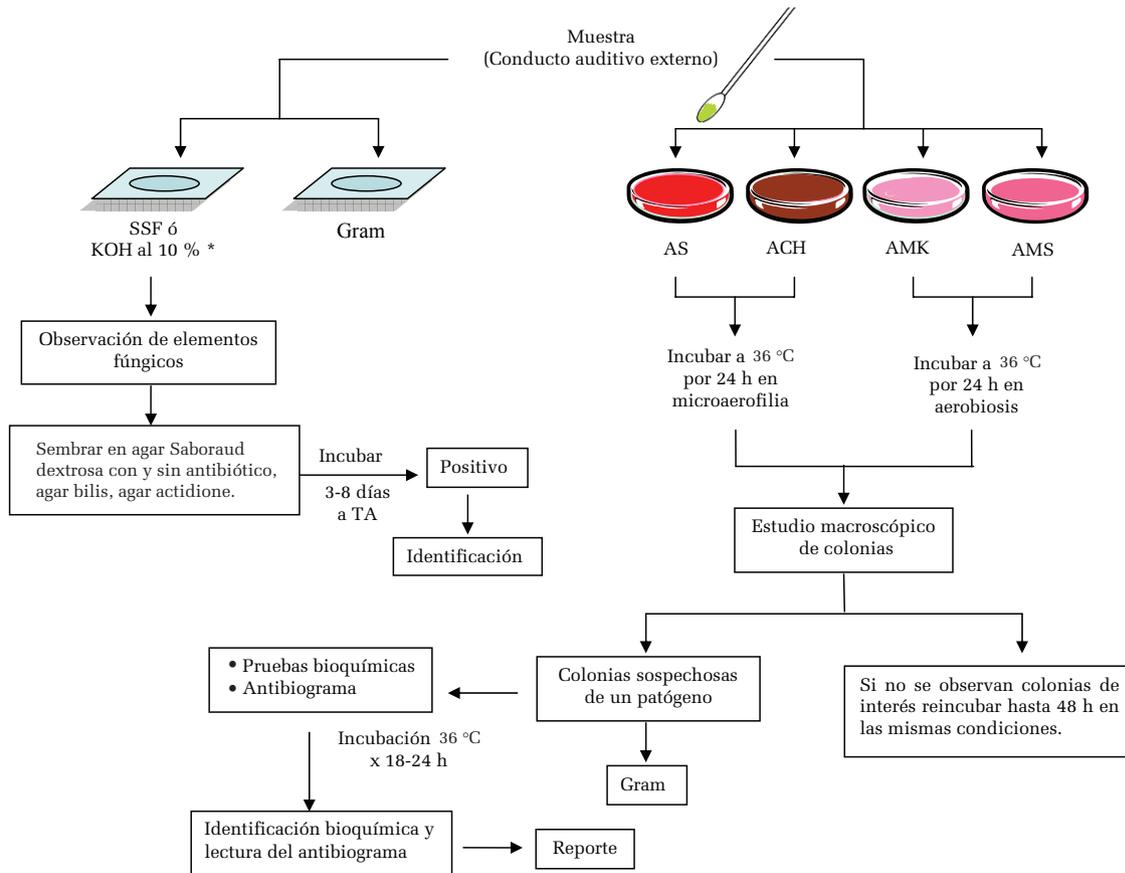


Figura 10. Procedimiento para el cultivo de secreción ótica

Segundo período

Materiales

- Hisopos estériles
- Solución salina fisiológica estéril (SSF)
- Medios de cultivo: Agar Mueller Hinton, agar Mueller Hinton más 5% de sangre.*, Mueller Hinton más 2% de cloruro de sodio*
- Patrón de McFarland.
- Discos de antibióticos.
- Equipos para tinción de Gram
- Láminas
- Pruebas bioquímicas dependiendo de la bacteria en estudio.

* Depende del microorganismo aislado.

Procedimiento

1. Revisión de los cultivos sembrados cada 24 horas hasta las 72 horas de incubación.

Describe las características observadas en cada medio de cultivo:

Agar sangre

Agar chocolate con suplemento

Agar Mac Conkey

Agar manitol salado

2. Hacer un extendido para la coloración Gram y observar microscópicamente los diferentes tipos de colonias encontrados en el cultivo.

Describe lo observado:

3. Hacer una suspensión en caldo BHI de la bacteria en estudio, si fuere necesario.
4. Realizar las pruebas bioquímicas dependiendo de la bacteria aislada por identificar e incubar dichas pruebas a temperatura y tiempo adecuado.

- Realizar prueba de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

Tercer período

Materiales

- Reactivo para prueba de oxidasa.
- Reactivo para prueba de catalasa.
(Peróxido de hidrógeno).
- Papel de filtro.
- Palillos de madera.

Lectura e interpretación de las pruebas bioquímicas.

Anote los resultados:

- Cotejar con tablas de identificación bacteriana.

- Leer prueba de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.

Etapa post-analítica

Realizar el reporte final (Anexo 2).

Autoevaluación

- ¿Cuáles son los diferentes tipos de muestra para el diagnóstico microbiológico de una infección ótica?
- ¿Qué medios de cultivo utilizaría usted en una secreción ótica?

3. ¿Qué factor contribuye a que en un niño de corta edad se instalen con mayor facilidad gérmenes de la región rinofaríngea?
4. Describa detalladamente los pasos a seguir para realizar una toma de muestra de secreción ótica del conducto auditivo externo.
5. ¿Qué medios de transporte utilizaría usted para trasladar una muestra tomada a distancia?
6. Nombre las diferentes bacterias patógenas que originan problemas óticos.
7. ¿Por qué se incluye examen en fresco con SSF y KOH 10%?
8. ¿Por qué los niños menores de 5 años son más propensos a sufrir de OMA?
9. Describa los pasos a seguir al realizar el informe de un paciente con secreción ótica.

Bibliografía

- (1) Ryan K, Ray C. Sherris. Microbiología médica. 4ª ed. México: Mc Graw Hill; 2004.
- (2) Bernáldez P, Morales G, Quantin L, Hernández C, Litterio M. Otitis media crónica supurada en niños. Arch. Argent Pediatr 2004; 102(3):174-179.
- (3) Villaseñor Sierra, A. Actualidades en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la otitis media aguda. Enferm Infec Microbiol 2004; 24 (3). Disponible en red: www.ami-mc.org.mx/revista/2004/vol_24-3/actualidades.htm
- (4) Pérez-Piñero B, Campos M, Castro-Conde J, López-Aguado D. Otitis media serosa. Canarias Pediátrica 2000; 24 (1): 65-76.
- (5) Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Microbiología médica. 4ª ed. España: Mosby; 2004.
- (6) Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. 4ª ed. Madrid: McGraw-Hill; 2000.
- (7) Montiel F, Lam M. Manual de microbiología clínica. Chile: Publicaciones Mediterráneo; 2001.

práctica 6

Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares

Kiralba Sánchez

Objetivo general

Desarrollar la estrategia metodológica para el diagnóstico de infecciones oculares.

Objetivos específicos

1. Enumerar los microorganismos de la flora habitual y los principales patógenos del órgano de la visión.
2. Describir los principales cuadros infecciosos que afectan al órgano de la visión.
3. Describir las condiciones del paciente y la técnica adecuada para la obtención de secreción y raspado conjuntival.
4. Obtener y procesar muestras de secreción y raspado conjuntival para la investigación de agentes productores de conjuntivitis.
5. Identificar los microorganismos de interés clínico según los esquemas convencionales del diagnóstico microbiológico.
6. Distinguir un proceso infeccioso de un proceso alérgico a través de la detección de eosinófilos.

Aspectos teóricos

El órgano de la visión en su conjunto cuenta con un sistema altamente especializado para hacerle frente a las injurias del medio ambiente externo, como una capa resistente de colágeno que recubre las estructuras intraoculares y membranas conjuntivales que tapizan los párpados y se extienden sobre la superficie del globo ocular. Las pestañas previenen la entrada de cuerpos extraños en el ojo durante el parpadeo (aproximadamente de 5 a 20 veces por minuto). Las secreciones de las

glándulas lagrimales y de las células caliciformes arrastran las bacterias y materiales extraños. Por otra parte, la lisozima y la Ig A son secretadas localmente coadyuvando en la defensa natural del ojo.(1)

En el saco conjuntival existe una microbiota habitual relativamente escasa. Entre los microorganismos que se encuentran con mayor frecuencia se citan: *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus* sp. y *Corynebacterium* sp. Entre 0-30% de las personas son portadores de *S. aureus* y *Haemophilus influenzae* no tipificables en 0,4-25%. En un pequeño porcentaje de individuos se presentan *Moraxella catarrhalis*, algunas Enterobacterias, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, otros alfa y beta-hemolíticos.(2)

Cuadros clínicos y etiología

- **Conjuntivitis:** es una de las causas más frecuentes de enfermedad ocular. Se define como un estado inflamatorio de la conjuntiva, con hiperemia conjuntival (dilatación de los vasos sanguíneos) o con hemorragia subconjuntival. La mayoría de las conjuntivitis son de etiología infecciosa (ocasionadas principalmente por virus o bacterias) y en algunos casos por procesos alérgicos.(3) En la tabla 14, se presentan los signos y síntomas diferenciales de la conjuntivitis aguda.

TABLA 14. Rasgos diferenciales de la conjuntivitis aguda					
Etiología	Características de la secreción	Tipo celular predominante	Edema palpebral	Prurito	Adenopatía
Bacteriana	purulenta	leucocitos polimorfonucleares	Moderado	no	no
Viral	clara	mononucleares	mínimo	no	frecuente
Alérgica	clara, mucoides en hebras	eosinófilos	Moderado a intenso	intenso	no

Tomado de: Beer y Berkow, 1999.

La conjuntivitis aguda es la presentación clínica más común, según su etiología se clasifica en:(3,4,5)

- **Conjuntivitis no gonocócica:** ocasionada frecuentemente por *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* biogrupo *aegyptius*, *Moraxella lacunata*; éstos se adquieren por inoculación mano-ojo y por fómites.

- **Conjuntivitis gonocócica:** producida por *N. gonorrhoeae*, afecta principalmente a los adultos que se contagian por un contacto sexual con sujetos con gonorrea o por autoinoculación (genital-mano-ojo). El neonato puede infectarse durante el paso por el canal de parto de la madre con infección gonocócica.
- **Conjuntivitis de inclusión:** causada por *Chlamydia trachomatis* serotipos D hasta la K, se produce en los adultos (por autoinoculación) y en los neonatos (durante el paso por el canal de parto infectado).
- **Conjuntivitis alérgica:** producida por una reacción de hipersensibilidad tipo I o anafiláctica frente a determinados antígenos, como pólenes que son transportados por el aire.

La conjuntivitis crónica: se caracteriza por exacerbaciones y remisiones durante meses o años. Los síntomas son similares a los de la conjuntivitis aguda, aunque menos intensos, puede presentarse hiperemia conjuntival con secreción acuosa, mucoide o sin ella. Las causas son variadas: infecciosas, alérgicas, iatrogénicas, entre otras.(3)

El tracoma: es un tipo de conjuntivitis crónica producida por *C. trachomatis* serotipos A, B, Ba y C; cursa con hipertrofia folicular conjuntival, neovascularización corneal y cicatrización grave de la conjuntiva, córnea y párpados, que pueden conducir a una pérdida irreversible de la visión.(5)

Otros cuadros clínicos menos frecuentes se citan a continuación:

- **Queratitis:** es la inflamación de la córnea producto de la aplicación de medidas quirúrgicas con fines curativos o correctivos y del uso indiscriminado de ciertos medicamentos tipo corticoesteroides o antibióticos, así mismo están implicados en un 60-90% las infecciones bacterianas producidas por: *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* o *Streptococcus* del grupo *viridans*, también levaduras como *Candida albicans*.(6)
- **Blefaritis:** es una inflamación del borde palpebral con hiperemia, engrosamiento y formación de escamas o costras o úlceras superficiales. Las de origen infeccioso son producidas principalmente por *S. aureus*. La blefaritis crónica es causada por *Demodex folliculorum*, especies de *Corynebacterium* y *Staphylococcus* sp.(3,6)
- **Orzuelo:** induración redondeada y dolorosa localizada en el folículo de la pestaña o en una o más glándulas de Zeis, Moll o de Meibomio. El microorganismo implicado generalmente es *S. aureus*.(3)

Diagnóstico

El diagnóstico etiológico de las infecciones oculares requiere de un cuidado minucioso en el momento de la obtención de la muestra. Es de resaltar que la muestra a seleccionar juega un papel muy importante para la detección de algunos microorganismos fastidiosos y complejos para su detección.

Etapa pre-analítica

El estudio epidemiológico del paciente incluye, además de los datos filiatorios del paciente, la impresión diagnóstica, evolución clínica del proceso infeccioso (ver cuadros clínicos), antecedentes de traumatismos, enfermedades subyacentes, usos de lentes de contacto, uso de corticoesteroides tópicos, entre otros.(2)

Etapa analítica

La obtención de la muestra constituye un punto clave para la consecución de un resultado confiable. En la tabla 15 se especifican los tipos de muestras que son requeridos según el cuadro clínico, asimismo, los microorganismos patógenos y potencialmente patógenos que se asocian a cada caso.(3,7)

TABLA 15. Tipos de muestras y patógenos a investigar en infecciones oculares

Cuadro clínico	Tipo de muestra	Patógenos a investigar
Conjuntivitis aguda	Secreción conjuntival Raspado conjuntival	<i>C. trachomatis</i> ¹ <i>H. influenzae</i> biogrupo <i>aegyptius</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Moraxella lacunata</i> Enterobacterias ² <i>P. aeruginosa</i> ²
Queratitis	Raspado de cornea ³	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Streptococcus</i> del grupo viridans <i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Acanthamoeba</i> sp. ⁴
Endoftalmitis	Aspirado de humor vítreo, líquido de cámara anterior por paracentesis ³	<i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>B. subtilis</i> ⁵ <i>Mycobacterium</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.
Celulitis orbital	Secreción purulenta Aspirado de lesión	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i>
Blefaritis	Raspado palpebral Pestañas ⁶	<i>S. aureus</i> <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Demodex folliculorum</i>

¹ Para la investigación de *C. trachomatis* obtener raspado conjuntival.

² En pacientes inmunocomprometidos.

³ Muestras obtenidas por el especialista en oftalmología.

⁴ En pacientes que usan lentes de contacto blandos.

⁵ En pacientes con antecedentes de traumatismo.

⁶ Sólo para la búsqueda de *Demodex folliculorum*.

Tomado de: Beers y Berkow, 1999; Mandell y col., 2002; Ryan y Ray, 2005.

Obtención y procesamiento de secreción ocular

Condiciones previas del paciente

- No aplicarse tratamientos tópicos.
- No estar recibiendo tratamientos antimicrobianos.
- No lavarse los ojos para el momento de la obtención de la muestra.

Procedimiento

En el caso de conjuntivitis, la muestra se obtendrá del ángulo interno del ojo.

1. Utilizar hisopos estériles de algodón o alginato de calcio
2. Humedecer el hisopo en solución salina fisiológica estéril
3. Rotar suavemente el hisopo en el ángulo interno del ojo
4. Cultivar cada ojo por separado en una misma placa AS y ACHs (Fig. 11).
5. Incubar a 36 °C, bajo condiciones microaerófilas por 24 h hasta 72 h.
6. Obtener muestras de cada ojo para realizar los preparados directos en láminas para teñir con Gram y Hansel.
7. Obtener raspado conjuntival del borde interno del párpado superior e inferior para la investigación de *C. trachomatis*, realizar el frotis siguiendo las instrucciones del docente y teñir con la coloración de Giemsa.

Observación: Para la investigación de otros microorganismos poco frecuentes en infecciones oculares se recomiendan los siguientes medios de cultivo:(2)

Anaerobios: caldo tioglicolato, agar sangre con base Schaedler

Micobacterias: Lowenstein-Jensen

Corynebacterium diphtheriae: medio inclinado de Loeffler, agar telurito de potasio

Hongos: Saboraud-glucosa con y sin antibióticos, agar bilis semisólido.

Interpretación del examen directo

Gram: observar la presencia de células epiteliales y microorganismos intra o extracelulares, presencia de células inflamatorias.

Hansel: para la investigación de polimorfonucleares eosinófilos, que orientan a un proceso alérgico.

Giemsa: para la observación de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, sugestivos de infección clamidial.

Revisión de los cultivos

1. Revisar los cultivos cada 24 horas, hasta las 72 horas
2. Inspeccionar las placas de AS y ACH, estimar el número de cada microorganismo en cada placa. El desarrollo de moderado o abundante crecimiento bacteriano, tercer o cuarto cuadrante de la placa respectivamente, podría indicar una etiología bacteriana de la infección. Al crecimiento de escasas colonias de algún patógeno, se le debe dar importancia. Estos hallazgos deben correlacionarse con el examen directo (Gram).

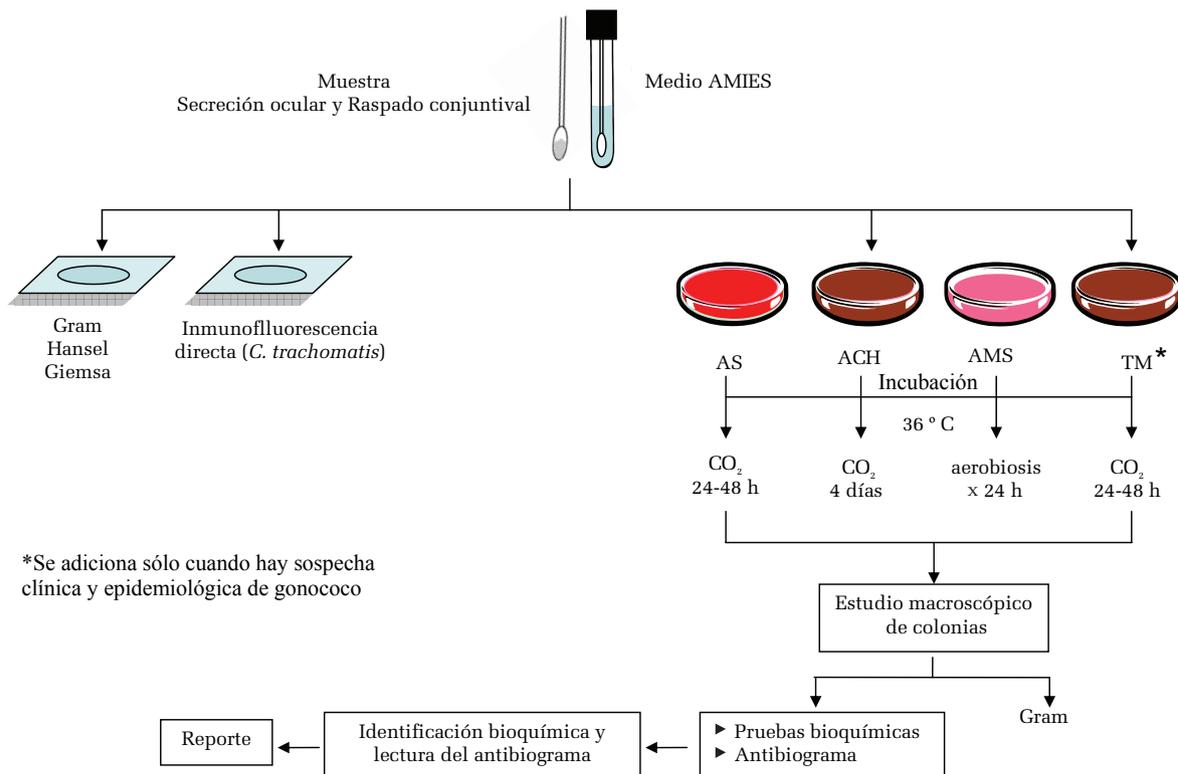


Figura 11. Procedimiento para el cultivo de secreción ocular y raspado conjuntival

Detección de *Chlamydia trachomatis*

C. trachomatis es uno de los microorganismos comúnmente involucrado en infecciones oculares tanto en el adulto como en el neonato. *C. trachomatis* es una bacteria intracelular obligada, por lo tanto, debe ser cultivada en líneas celulares, lo cual resulta impráctico para uso rutinario en los laboratorios de diagnóstico clínico. Entre los métodos de diagnóstico disponibles para detectar la infección clamidial se incluyen el examen microscópico directo a partir de raspado tisular, teñidos con Giemsa, éste método tiene una sensibilidad del 60% a partir de este tipo de muestra.(8)

Alternativamente, existe en el comercio una prueba rápida de inmunodiagnóstico como la Inmunofluorescencia Directa (IFD) que muestra una buena sensibilidad y especificidad a partir de raspado ocular. Otras técnicas disponibles comercialmente para la investigación de patógenos fastidiosos como es el caso de *C. trachomatis* son las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos: reacción en cadena de la polimerasa (RCP), reacción en cadena de la Ligasa (RCL) y la amplificación mediada por transcripción (AMT).(8)

Un aspecto fundamental que influye en la detección de *Chlamydia*, es la obtención de la muestra, esta bacteria infecta específicamente a las células del epitelio columnar del tejido conjuntival, por lo que la muestra debe ser obtenida por raspado, teniendo cuidado de retirar previamente las secreciones purulentas que cubran la mucosa.(4)

Etapa post-analítica

- Describir los hallazgos al examen directo (Gram): tinción y morfología de todos los microorganismos con significancia clínica. Así mismo, registrar si los microorganismos se encuentran intra o extracelularmente y la presencia de células inflamatorias. A partir de Hansel reportar los eosinófilos; del extendido teñido con Giemsa, los hallazgos positivos se reportan: “Se observaron cuerpos de inclusión sugestivos de *Chlamydia trachomatis*”.
- Reportar la cantidad (escasa, moderada o abundante) del microorganismo aislado en cultivo puro o aquel que se le haya dado valor por su crecimiento predominante.
- Si están presentes microorganismos indígenas y se ha determinado que son contaminantes para el caso, incluir el siguiente comentario: “Presencia de microbiota indígena conjuntival” o “Desarrollo de microbiota habitual de la región”.(6)

6 Actividad práctica

Primer período: Obtención y siembra de secreción ocular y raspado conjuntival

Materiales

- Hisopos estériles
- Láminas portaobjetos
- Medios de cultivo: agar Sangre, agar chocolate suplementado, agar manitol salado.
- Solución salina fisiológica estéril.
- Asa de platino
- Coloración de Gram, Hansel y Giemsa.

Procedimiento

1. Elaborar la ficha clínico-epidemiológica del paciente (Anexo1).
2. Preparar todo el material necesario para la obtención de la muestra. Rotular las placas que contienen los medios de cultivo y las láminas portaobjetos con el código correspondiente.
3. Recolectar la secreción del ángulo interno del ojo afectado. Proceder a inocular los medios de cultivo y estriar la muestra por agotamiento. Se recomienda obtener secreción del ojo no afectado para tener un patrón de referencia acerca de la microbiota habitual ocular del paciente. Incubar bajo las condiciones mencionadas.
4. Con un hisopo realice dos láminas, una, para teñir con Gram, y otra, para teñir con Hansel.
5. Practicar la obtención de raspado conjuntival, para ello retire con un hisopo estéril el exceso de secreción, proceda al raspado de la conjuntiva inferior y superior luego de la eversión del párpado.
6. Realizar el frotis con la muestra obtenida, distribuyendo la misma siguiendo un patrón en zig-zag, tratando de que la muestra quede bien extendida sin formar acúmulos (Fig. 12).
7. Fijar las láminas según las indicaciones para cada técnica de coloración.

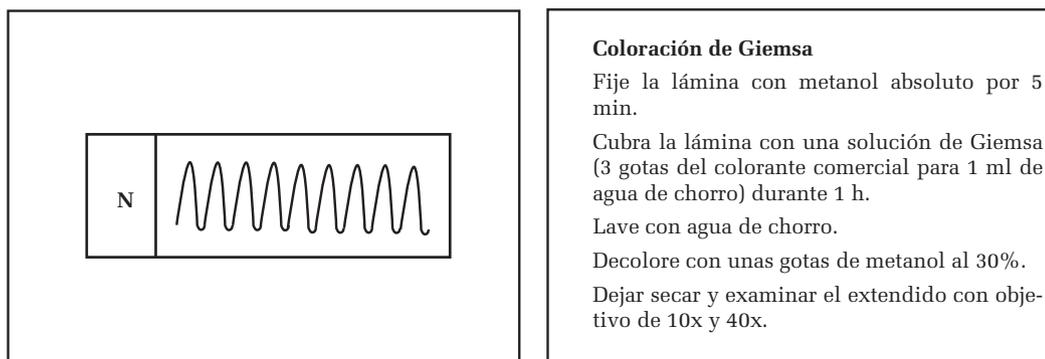


Figura 12. Representación esquemática del extendido para Giemsa

Segundo período: Revisión de los cultivos.

Materiales

- Láminas portaobjeto
- Asa de platino
- Solución salina fisiológica estéril
- Medios de cultivo: AS, ATS, caldo BHI, agar Mueller Hinton (MH)
- Viales con discos de antibióticos.
- Batería bioquímica para identificación bacteriana.
- Patrón Mc Farland 0,5
- Papel filtro y palillos de madera
- Equipo de coloración de Gram
- Agua oxigenada al 3%

Procedimiento

1. Evaluar cada placa de cultivo según el desarrollo bacteriano (escaso, moderado o abundante), las características morfológicas de las colonias y la presencia o no de hemólisis.
2. Seleccionar el microorganismo que desarrolle en cantidad moderada o abundante, cuidando que se corresponda con lo observado en el examen directo. Proceder a la purificación de la o las colonias de interés microbiológico en AS ó ATS y en caldo BHI.
3. Inocular la batería bioquímica adecuada según las características morfológicas y tintoriales del microorganismo.
4. Realizar el antibiograma (método Kirby-Bauer).

Tercer período: Identificación bacteriana

Materiales

- Peróxido de oxígeno al 3%
- Láminas portaobjeto
- Palillos de madera
- Tablas de identificación bacteriana

Procedimiento

1. Leer las pruebas bioquímicas inoculadas en el período anterior.
2. Practicar (si aplica) la prueba de la catalasa a partir del caldo BHI, según el caso.
3. Cotejar con las tablas de identificación bacteriana.
4. Leer e interpretar el antibiograma.
5. Registrar y elaborar el reporte respectivo (Anexo 2).

Autoevaluación

1. Enumerar los microorganismos que forman parte de la microbiota habitual del órgano de la visión.
2. Señale los agentes infecciosos más importantes productores de infecciones oculares y mencione para cada caso el tipo de muestra a seleccionar.
3. Explique la importancia de la coloración de Hansel en el diagnóstico de una conjuntivitis.
4. Esquematice el diagnóstico de una conjuntivitis por *C. trachomatis*.
5. ¿Cuál es la importancia de los métodos moleculares en el diagnóstico de las infecciones oculares?

Bibliografía

- (1) Mandell G, Bennett J, Dolin R. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 5ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 2002.
- (2) Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. 5ª ed. España: Médica Panamericana; 2001.
- (3) Beers M, Berkow R. El Manual Merck. 10ª ed. España: Harcourt; 1999.
- (4) Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Microbiología médica. Texto Atlas Color. 4ª ed. España: Mosby Elsevier Science; 2002.
- (5) Ryan K, Ray C. Sherris Microbiología médica. 4ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2005.
- (6) Isenberg H, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1992.
- (7) Araque M, Nieves B, Sánchez, K, Velásquez A, Velazco E, Vizcaya L. Manual práctico de bacteriología. Universidad de Los Andes. Venezuela; 1999.
- (8) Di Bartolomeo S, Janer D, Rodríguez F, Sauka D, Margarinas T. Incidente of Chlamydia trachomatis and other potencial pathogens in neonatal conjunctivitis. Int J Infect Dis 2001; 5:139-143.

práctica 7

Diagnóstico microbiológico de las Infecciones del Tracto Urinario (ITU). Urocultivo

Aurora Longa / Judith Velasco

Objetivo general

Aplicar los métodos convencionales para el diagnóstico microbiológico de infecciones del tracto urinario (ITU).

Objetivos específicos

1. Describir las condiciones adecuadas para la toma y transporte de la muestra de orina.
2. Sembrar la muestra de orina por el método del asa calibrada.
3. Cuantificar la carga bacteriana.
4. Identificar el (los) microorganismo(s) aislado(s).
5. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana del (los) microorganismo(s) aislado(s).
6. Analizar los resultados obtenidos.
7. Reportar los resultados siguiendo las normas de taxonomía y de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Aspectos teóricos

El término ITU define la presencia de microorganismos en las vías urinarias, siendo las patologías más frecuentes cistitis (infección de la vejiga) y pielonefritis (infección del riñón y su pelvis).(1)

Epidemiología

Las ITU son de las enfermedades más frecuentes, en particular en mujeres. Su prevalencia es dependiente de la edad y el género. Casi 1% de los niños, muchos con

anomalías funcionales o anatómicas del aparato urinario, presenta infección durante el período neonatal.(2) Se calcula que 20% o más de la población femenina sufre alguna forma de ITU en su vida. La infección en la población masculina es rara hasta el quinto decenio de la vida, cuando el crecimiento de la próstata empieza a obstaculizar el vaciamiento de la vejiga. En los ancianos de ambos sexos las intervenciones quirúrgicas ginecológicas o prostáticas, la incontinencia, la instrumentación y el sondeo uretral crónico favorecen tasas de ITU de 30 a 40%. Un solo sondeo vesical conlleva riesgo de infección del 1% y al menos 10% de los individuos con sondas a permanencia se infecta.(3)

Patogenia

La orina, producida en el riñón y descargada a través de la pelvis renal y los uréteres hacia la vejiga, es estéril en el individuo sano. Se desarrolla infección cuando las bacterias logran ingresar a ese ambiente y pueden persistir en él, sobre todo a través de una vía ascendente de bacterias residente de la flora perineal, provenientes de la flora del intestino grueso. Entre los factores que favorecen el acceso de las bacterias el más importante es el coito, que desplaza bacterias de forma transitoria al interior de la vejiga y pone en riesgo a la mujer por la corta longitud de la uretra. Otro es la manipulación de la uretra como el sondeo. Las bacterias también pueden alcanzar las vías urinarias desde la corriente sanguínea, lo cual es menos frecuente y requiere una infección en otro sitio. La persistencia se favorece por factores del hospedero que interrumpen o retardan el flujo urinario, como instrumentación, obstrucción o anomalías estructurales. Los factores bacterianos incluyen la capacidad de adherirse al uroepitelio y producir otros factores como las exotoxinas. Los miembros del género *Proteus*, productores de ureasa, se vinculan con cálculos urinarios, que por sí mismos son factores que predisponen a la infección.(3)

Diagnóstico

El diagnóstico de laboratorio de una ITU se realiza a través del urocultivo, el cual consiste en el cultivo bacteriológico de la orina para determinar la presencia y cuantificación de gérmenes patógenos. Para la evaluación de estos gérmenes y de su potencial importancia en un proceso infeccioso de las vías urinarias es imperativo conocer los siguientes aspectos:(1)

Flora habitual de los genitales externos y la uretra anterior

Estafilococos coagulasa negativa, Corinebacterias no patógenas (difteroides), Enterobacterias: *Escherichia* sp., *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. entre otras.

Micobacterias saprofitas, especialmente *Mycobacterium smegmatis*, Levaduras y *Streptococcus* sp. Todos estos microorganismos pueden contaminar fácilmente las muestras de orina sin que ello signifique infección, por eso se deben seguir estrictamente las normas que se explican más adelante, que permiten recolectar y conservar correctamente las muestras para urocultivo.

Agentes productores de ITU

Todo microorganismo puede potencialmente producir infección urinaria; sin embargo, las más frecuentes son:

Escherichia coli (85% aproximadamente), *Proteus* sp. (especialmente *Proteus mirabilis*), *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* sp., *Enterobacter* sp.

Pseudomonas sp., *Serratia* y *Acinetobacter* generalmente en pacientes hospitalizados con sondas permanentes o con otra patología de base.

Levaduras, *Staphylococcus saprophyticus* (generalmente en mujeres en edad reproductiva), *Haemophilus*, principalmente en niños.

Del hospedero

Para interpretar correctamente el resultado del urocultivo es importante conocer la epidemiología, condiciones generales y la clínica del paciente, tales como: enfermedades metabólicas, estrechez uretral, hipertrofia prostática, desórdenes neurogénicos.

En estos casos una buena relación entre el médico y el microbiólogo es determinante para un diagnóstico preciso.

Urocultivo

Etapa pre-analítica

Antes de iniciar el estudio de la muestra, el microbiólogo debe conocer algunos datos concernientes al paciente: edad, género, factores predisponentes, síntomas, antecedentes de ITU, tratamiento actual o previo con antibióticos. El paciente no debe haber recibido terapia antimicrobiana durante los tres días anteriores a la recolección, excepto en los casos de control de tratamiento y pacientes gravemente enfermos.

Recomendaciones previas a la toma de muestra

Mujeres: se debe higienizar la zona genital con agua y jabón, de adelante hacia atrás, secarse con toalla limpia, se deben colocar un tapón vaginal (torunda de gasa o algodón) y se recomienda orinar separando los labios mayores.

Hombres: se debe retraer el prepucio e higienizar el glande y surco balanoprepucial con agua y jabón (no usar antisépticos). Se elimina el primer chorro de orina y luego se recolecta en un envase estéril la fracción siguiente.

Recolección de la muestra

- **Niños y adultos que controlan esfínteres:** La muestra de elección es el chorro medio miccional, entre 15 a 30 ml. El tiempo de retención deseado es por lo menos 3 o 4 horas, siendo la muestra más representativa la primera orina de la mañana.
- **Niños y adultos que no controlan esfínteres**
 - Al acecho:** se aplica a los lactantes y es similar al descrito para los pacientes que controlan esfínteres. El operador deberá esperar el momento de la micción y recogerá en un envase estéril lo que seguramente será la porción media del chorro miccional.
 - Punción suprapúbica:** se reserva para casos especiales por ejemplo: pacientes cuyos urocultivos previos presentan resultados conflictivos, neonatos graves, entre otros. Deberá ser realizada por médicos entrenados.
 - Cateterización:** Debe ser realizada por personal entrenado y se recomienda en enfermos con vejiga neurogénica, lactantes entre otros. La muestra recolectada debe ser la porción media del chorro de orina que sale por la sonda.
- **Enfermos sondados:** Nunca tomar la orina que fluye del extremo distal de una sonda que no es nueva. En caso de estar recién colocada tomarla directamente del extremo distal en un recipiente estéril.

Punción de la sonda: se realiza en aquellos pacientes con sonda permanente. 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 con una jeringa estéril, colocando posteriormente el contenido en un envase estéril.

Conservación y transporte de la muestra: La muestra para urocultivo debe refrigerarse a 4 – 8 °C inmediatamente después de recolectada. Si el traslado al laboratorio demora más de 15 minutos, debe colocarse el recipiente con la orina dentro de un contenedor con hielo. Este procedimiento permitirá que el número de microorganismos permanezca relativamente constante por un tiempo no mayor de 24 horas.

Etapa analítica

Procesamiento de la muestra: antes de iniciar el estudio de la muestra, el microbiólogo debe conocer algunos datos concernientes a la misma.

Muestra: tipo de recolección: chorro medio, punción suprapúbica, sonda (punción, sonda nueva). Conservación.

Examen directo

1. Examen macroscópico: olor, color, aspecto, pH, densidad.
2. Examen microscópico: estudio del sedimento (en fresco): se centrifuga entre 10 - 15 ml de orina a 3000 rpm durante 10 min, el sedimento obtenido se coloca entre lámina y laminilla y se observa al microscopio con objetivo de 40X.

Interpretación

- Presencia de 5 o más leucocitos por campo, es signo inequívoco de piuria y refuerza el diagnóstico de infección.
 - La demostración de cilindros leucocitarios en una muestra en la que se ha identificado un germen con recuento significativo, sugiere posibilidades de pielonefritis.
 - En infecciones vesicales agudas, además de piuria, puede comprobarse hematuria.
 - La presencia de gran cantidad de células epiteliales escamosas, evidencia contaminación y la necesidad de repetir la muestra.
3. Preparación del frotis: Se toma una gota (con pipeta Pasteur) o una asada de orina, se coloca sobre una lámina portaobjeto y se deja secar sin extender, luego se fija y se colorea con la técnica de Gram. Cuando se sospecha de tuberculosis renal, la orina se centrifuga y se toma una gota del sedimento, se coloca sobre una lámina portaobjeto, se deja secar sin extender, se fija y se colorea con la técnica de Zielh Neelsen, para la búsqueda de bacilos ácidos resistentes.

Interpretación

- La observación de una o más células microbianas por campo de inmersión se presenta en muestras con contajes mayores de 100.000 colonias/ml de orina, acompañadas generalmente por al menos un leucocito cuando existe piuria.
- En las muestras que contienen contajes menores de 100.000 colonias/ml de orina, generalmente no se observan microorganismos ni células.

- La presencia de muchas células epiteliales escamosas así como de una flora vaginal mixta, evidencia contaminación y la necesidad de repetir la muestra.
4. Cultivo y recuento de colonias: Permite diferenciar la verdadera bacteriuria de una contaminación. Se conocen varios métodos para determinar la cantidad de microorganismos.
- **Método de dilución en tubo o método de Kass:** Es un método poco práctico, muy laborioso, está basado en diluciones 1:100 y luego 1:10.000 de la orina, depositadas en placas estériles a las que se les agrega el agar fundido. Después de varios pasos se observa el crecimiento en las diferentes placas.
 - **Método del asa calibrada:** Es un método práctico, sencillo y económico, que consiste en sembrar la orina sin centrifugar con un asa calibrada a 0.001 ml (3mm de diámetro) o 0,01 ml (4mm de diámetro).

En la elección de los medios de cultivo debe considerarse la recuperación de la mayoría de los patógenos, con el menor costo posible. Generalmente se recomienda la utilización de un agar sangre (AS) y un agar CLED o un medio selectivo diferencial como MK o EMB. En niños incluir un agar chocolate suplementado para la recuperación de *Haemophilus*.(4)

Agar CLED (cistina-lactosa-electrolito-deficiente): utilizado como medio diferencial para el aislamiento, conteo e identificación de microorganismos en orina; su contenido en cistina y lactosa y la presencia del azul de bromotimol (como indicador de pH) facilitan diferenciar a las bacterias fermentadoras de lactosa, que acidifican el medio, virando el indicador de pH al color amarillo (color que toman las colonias). Por otra parte, la deficiencia en electrolitos inhibe el carácter invasor de las colonias de *Proteus*.(5, 6)

Nota: en caso de muestras obtenidas por punción suprapúbica, se recomienda utilizar un medio para la recuperación de bacterias anaerobias (Ver práctica infecciones por bacterias anaerobias).

Procedimiento

1. Mezclar cuidadosamente la orina restante.
2. Insertar el asa estéril verticalmente en la muestra y luego diseminarla sobre la superficie de la placa desde el centro, formando una línea y posteriormente hacer estrías sobre la placa cruzando la línea del inóculo varias veces (Fig. 14).
3. Incubar las placas durante 18–24 horas a 37 °C en aerobiosis y el AS en microaerofilia y en anaerobiosis si la muestra así lo exigiera. En caso de tener cultivos negativos a las 24 horas, se deben incubar 24–48 horas más.

Análisis cualitativo

La identificación de los agentes se hace mediante el estudio de las características microscópicas de las colonias y la utilización de los sustratos del medio, ejemplo: lactosa, hemólisis y la identificación final a través de pruebas fisiológicas diferenciales, como la prueba de la oxidasa, acción sobre azúcares.

Análisis cuantitativo

Contar el número de colonias y multiplicar por el factor 1000 o 100, de acuerdo a la capacidad del asa utilizada, para determinar las unidades formadoras de colonia por mililitro de orina (UFC/ml).

Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

Generalmente se usa el método de Kirby Bauer, tomando en cuenta para la elección de los antibióticos el agente aislado y aquellos que más se utilizan en el tratamiento de las ITU.

Etapa post-analítica

Informe de resultados

Datos personales del paciente: Nombre y apellidos, cédula de identidad.

Nombre del médico tratante

Fecha de recepción de la muestra y emisión del reporte.

Tipo de muestra: Orina (especificar método de recolección)

Examen realizado: Urocultivo o cultivo y antibiograma

Resultados del examen directo: fresco o frotis

Agente microbiano aislado (género y especie) y recuento de colonias:

Recuento de colonias:

Generalmente un recuento de 10.000 o menos colonias por ml de orina indica contaminación y un recuento de 100.000 o más, indica infección.

Cuando se obtienen valores intermedios, el examen debe ser repetido, ya que existen factores como, por ejemplo, la obstrucción uretral, diuresis, infecciones crónicas e infecciones por cocos grampositivos, que pueden explicar recuentos bajos en infecciones urinarias verdaderas.

Antibiograma.

TABLA 16. Criterios para informar recuentos en urocultivos			
Recuento de colonias (UFC/ml)	Método de recolección	Microorganismo (s) presentes	Pasos a seguir
0		Ninguno	Reporte negativo
Cualquier recuento	Punción suprapúbica	Todas las especies	Identificar microorganismo
10.000 – 100.000	Cualquier método y condición	Cultivo puro de levaduras Cultivo puro de <i>Staphylococcus aureus</i>	Identificar microorganismo
1.000	Orina por sonda uretral Hombre sintomático Control post-tratamiento	Cultivo puro de probables patógenos	Identificar microorganismo
10.000	Orina por sonda uretral	Dos especies de probables patógenos	Identificar microorganismo
100.000	Orina de chorro medio	Cultivo puro de probables patógenos Dos especies de probables patógenos e infección Sintomática Tres o más especies	Identificar microorganismo Identificar microorganismo Identificar microorganismo

Tomado de: Montiel y Lam, 2001.

7 Actividad práctica

Urocultivo

Primer período

Materiales

- Muestra de orina
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos.
- Asa calibrada
- Agar sangre y agar CLED, MacConkey o EBM.
- Coloración de Gram

1. Llenar la planilla de registro del laboratorio con los datos personales, epidemiológicos y clínicos del paciente.
2. Realizar el examen macroscópico y microscópico (Sedimento y Gram) de una muestra de orina y describir lo observado en cada caso.
3. Sembrar la muestra de orina en AS y CLED o MK o EMB, utilizando el asa calibrada e incubar en las condiciones ya señaladas (Fig. 13 y 14).

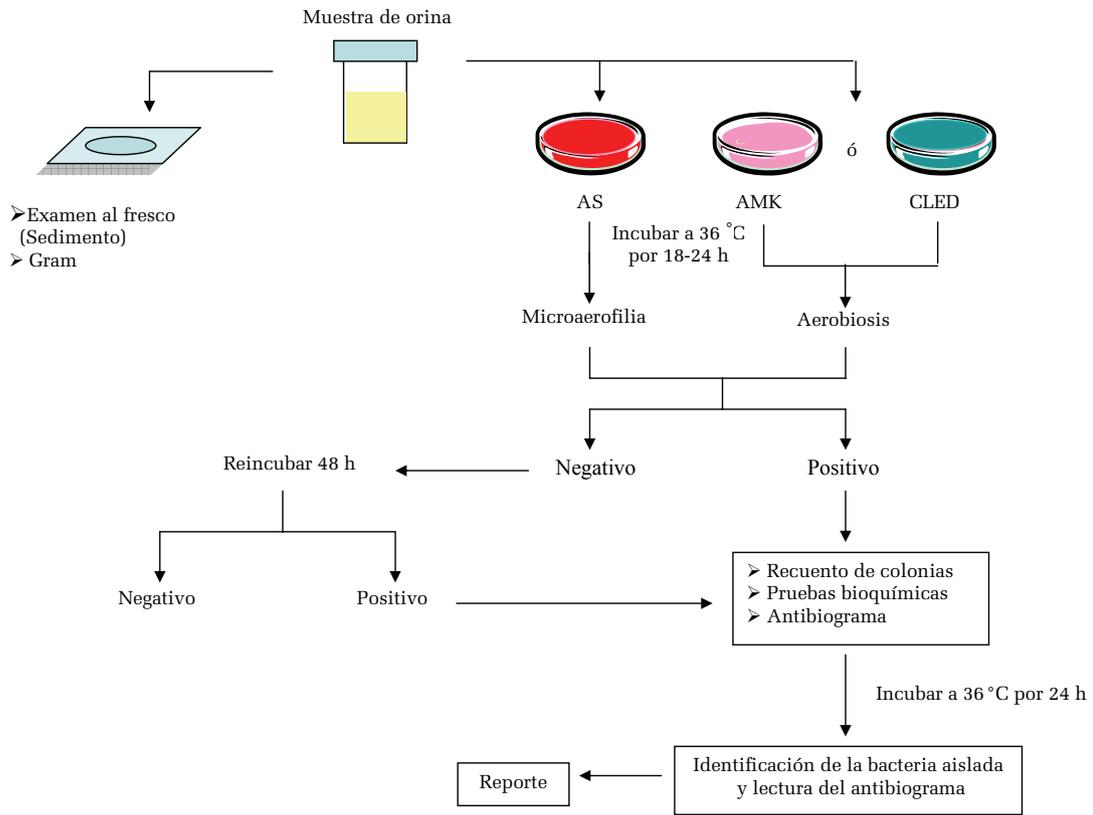


Figura 13. Urocultivo

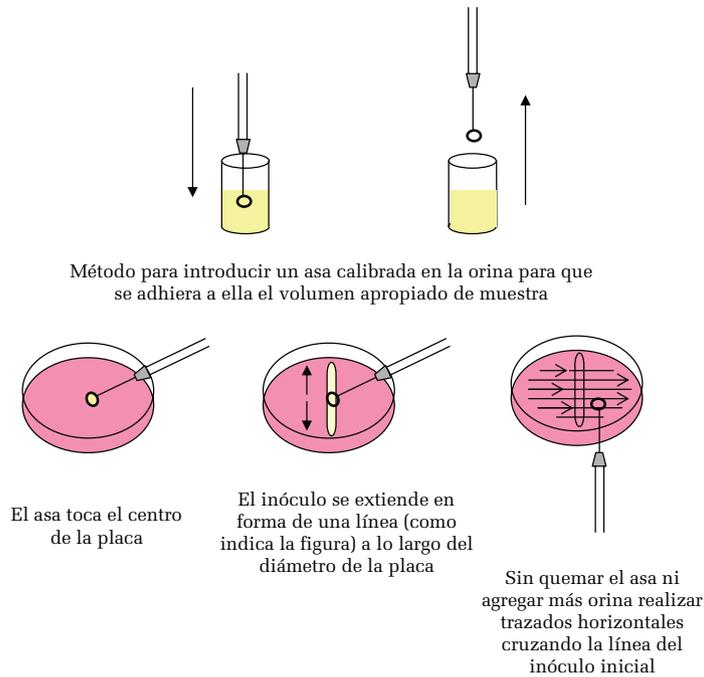


Figura 14. Método del asa calibrada

Segundo período

Materiales

- Pruebas bioquímicas
- Reactivo de oxidasa
- Reactivo para la prueba de catalasa
- Papel de filtro
- Palillos de madera
- Agar Mueller Hinton
- Patrón de MacFarland 0,5
- Hisopos estériles
- Discos de antibióticos
- Pinza sin dientes

Procedimiento

1. Observar las placas sembradas en el período anterior, describa las características observadas en cada medio y realice el conteo de colonias.
2. De acuerdo a las características macroscópicas y microscópicas observadas, ¿sospecha de un agente en particular? Escriba el nombre.
3. Con base en la morfología y tinción observada en el examen directo de la muestra de orina coloreada con Gram y el estudio de las características de las colonias y su efecto sobre el medio del agente etiológico, seleccione y siembre las pruebas fisiológicas que le permitirán identificar el microorganismo, así como los antibióticos para la prueba de sensibilidad de acuerdo al agente presuntamente identificado y los datos clínicos y epidemiológicos.
4. Incubar a 37 °C durante 24 horas.

Tercer período

Materiales

- Reactivo de Kovacs
- Reactivo de oxidasa
- Reactivo FeCl₃

Procedimiento

1. Realizar la prueba de la oxidasa si es el caso.
2. Realizar la lectura de las pruebas fisiológicas montadas en el período anterior e identifique el agente aislado.
3. Realizar la lectura de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana.
4. Elaborar el informe definitivo de los resultados.

Cultivos negativos: Negativo a las 48 horas de incubación o no se observó desarrollo bacteriano hasta las 48 horas de incubación.

Cultivos positivos: Desarrollo de **número** de UFC/ml de orina de **nombre del microorganismo**.

Ejemplo: Desarrollo de más de 100.000 de UFC/ml de orina de *Escherichia coli*.

Autoevaluación

1. Mencionar en orden de frecuencia las especies bacterianas productoras de ITU.
2. Describir la técnica más utilizada para el diagnóstico microbiológico de una ITU.
3. Señalar las condiciones de conservación y transporte de una muestra de orina para urocultivo, justificar la respuesta.
4. Mencionar los antibióticos más utilizados para el tratamiento de una ITU.
5. Definir los siguientes términos: disuria, poliaquiuria, piuria, cistitis, pielonefritis.
6. Mencionar la ventaja de incorporar el medio CLED en el urocultivo.

Bibliografía

- (1) Vizcaya L. En Araque M, Nieves B, Sánchez K, Velásquez A, Velazco E, Vizcaya L. Manual práctico de bacteriología. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia, Escuela de Bioanálisis, Departamento de Microbiología y Parasitología, Cátedra de Bacteriología Clínica. 1.999.
- (2) Zorc J, Kiddoo D, Shaw K. Diagnosis and management of pediatric urinary tract infections. Clin Microbiol Rev 2005, 18(2): 417-422.
- (3) Ryan K, Ray C. Sherris, Microbiología médica. 4^a ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2004.
- (4) Alcoba J, Gutiérrez I, Batista N, García V. Infección urinaria por *Haemophilus influenzae* como manifestación inicial de alteración renal. Enferm Infec Microbiol Clin 2004; 22(2):125-127.
- (5) Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Escuela de Medicina “Luis Razetti”, Cátedra de Microbiología. Guía de trabajos prácticos, Caracas 2000.
- (6) Delgado A, Amich S, Prieto S, Salve M. Manual de laboratorio clínico básico: Microbiología. Colombia: McGraw-Hill; 2000.
- (7) Montiel F, Lam M. Manual de microbiología clínica. Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda.; 2001.

práctica 8

Diagnóstico microbiológico de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). Coprocultivo

Judith Velasco / Aurora Longa

Objetivo general

Aplicar los métodos convencionales para el diagnóstico microbiológico de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA).

Objetivos específicos

1. Describir las condiciones adecuadas para la toma y transporte de la muestra de heces.
2. Aislar los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la EDA.
3. Identificar los agentes etiológicos bacterianos involucrados en la EDA.
4. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana del (los) microorganismo(s) aislado(s).
5. Analizar los resultados obtenidos.
6. Reportar los resultados obtenidos, siguiendo las normas de taxonomía y de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

Aspectos teóricos

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.(1,2)

La terapia de rehidratación oral, se ha identificado como la medida más eficaz para la reducción de la mortalidad por diarrea. Una mayor reducción de la misma se alcan-

zará al lograr el tratamiento integral de los casos, particularmente en los cuadros de disentería y de diarrea persistente.(1)

La etiología de la enfermedad diarreica es diversa y numerosos esfuerzos se han realizado para tratar de explicarla, observándose que el factor infeccioso continua siendo el más importante, sin duda, por su carácter transmisible. De los agentes infecciosos, los bacterianos se encuentran entre los más frecuentes en todos los países del mundo.

La utilidad del diagnóstico de la diarrea se enfoca fundamentalmente desde dos puntos de vista:

1. El clínico, para la atención y seguimiento de pacientes, particularmente cuando está indicado el tratamiento con antibiótico-terapia, como, por ejemplo, en la disentería.
2. Desde el punto de vista de salud pública: control de brotes, vigilancia epidemiológica y estudio sobre vacunas.

Definiciones operativas:

- **Diarrea aguda:** incremento en el número o volumen de las heces de 72 horas o menos de duración.
- **Diarrea crónica o persistente:** incremento en el número o volumen de las heces de más de 14 días de duración.
- **Disentería:** historia de moco o sangre en las heces con tenesmo o dolor al defecar y temperatura axilar de 38,5 °C.
- **Gastroenteritis:** diarrea líquida de color amarillo verdosa o no, acompañada con vómito y fiebre en algunas oportunidades.
- **Fiebre entérica:** fiebre, cefalea, dolor abdominal, bradicardia relativa, esplenomegalia y leucopenia. Ej: Fiebre tifoidea.

El estudio de la material fecal, para el aislamiento e identificación de las bacterias productoras de diarrea se denomina: coprocultivo.

Al realizar un coprocultivo es importante tener presente:

Flora bacteriana intestinal

En el intestino delgado, el duodeno es estéril, en el yeyuno aparecen enterococos, lactobacilos y difteroides, en el íleon se suman algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y anaerobios gramnegativos, en una proporción de aproximadamente 10^5 por gramo de heces.

En el intestino grueso, la flora habitual constituye el 50% del peso seco de las heces.

Las bacterias anaerobias que se encuentran en mayor proporción son las siguientes: *Bacteroides* 100%, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus* y *Clostridium*.

Las bacterias anaerobias facultativas o aerobias son las siguientes: *E. coli* 100%, *Klebsiella* y *Enterobacter* 40 – 80%, *Proteus* 5-50%, *Citrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp. 100%, *Staphylococcus* 30-50%.

Esta flora se mantiene en equilibrio por diferentes mecanismos tales como: producción de bacteriocinas y sustancias tóxicas como ácidos grasos, entre otras.

Etiología y patogenia

En la trascendencia del proceso diarreico, interviene no solo la patogenicidad del agente, sino la respuesta particular del huésped y de su propio ecosistema microbiano, esto trae como consecuencia que el espectro de respuestas clínicas varíe de un individuo a otro, manifestándose en unos, con enfermedades clínicas graves, en otros, con síntomas leves, y en otros, con infección intestinal subclínica, de allí que algunas veces al realizar coprocultivos en personas sin diarrea, se aislen enteropatógenos.

En la Tabla 17, se exponen los microorganismos relacionados más a menudo con procesos diarreicos, el posible mecanismo de patogenicidad del agente y el sitio de acción.

TABLA 17. Características de los síndromes infecciosos gastro-intestinales				
Microorganismo	Síndrome clínico	Mecanismo de patogenicidad	Localización anatómica	Microscopía de heces
Virus				
Rotavirus	Diarrea acuosa	Alteración de células absortivas	Intestino grueso	-
Bacterias				
ECET	Diarrea acuosa	Enterotoxina(s)	Intestino delgado	-
ECEP	Diarrea acuosa	Adherencia y destrucción de microvellosidades	Intestino delgado	-
ECEH	Colitis hemorrágica	Citotoxina	Intestino grueso	GR
ECEI	Diarrea disintérica	Invasión de la mucosa	Intestino grueso	PMN (85%), GR
Serotipos de <i>Salmonella</i>	Disentería	Invasión de la mucosa	Intestino delgado/grueso	PMN
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre entérica o tifoidea	Translocación bacteriana intestinal (penetración y diseminación)	Intestino delgado/grueso	Monocitos (95%)
<i>Shigella</i> sp.	Diarrea disintérica	Invasión de la mucosa, citotoxina	Intestino grueso	PMN (84%), GR
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Fiebre entérica	Translocación bacteriana intestinal (penetración y diseminación)	Intestino delgado/grueso	-

Continuación TABLA 17.

Microorganismo	Síndrome clínico	Mecanismo de patogenicidad	Localización anatómica	Microscopía de heces
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Diarrea acuosa	Enterotoxina	Intestino delgado / grueso	-
	Diarrea disintérica	Invasión de la mucosa		PMN, GR
<i>Campylobacter jejuni</i>	Diarrea disintérica	Invasión de la mucosa, citotoxina	Intestino delgado / grueso	PMN, GR
	Diarrea acuosa	Enterotoxina	Intestino delgado	-
<i>Aeromonas</i> sp.	Diarrea disintérica	Invasión de la mucosa	Intestino delgado / grueso	PMN, GR
	Diarrea acuosa	Enterotoxina	Intestino delgado	-
<i>Vibrio cholerae</i>	Diarrea acuosa	Enterotoxina	Intestino delgado	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Diarrea acuosa	Se desconoce	Intestino delgado	-
Parásitos				
<i>Entamoeba histolytica</i>	Diarrea disintérica	Invasión de la mucosa	Intestino grueso	Monocitos
<i>Giardia lamblia</i>	Diarrea acuosa	Irritación de la mucosa	Intestino delgado	-
<i>Cryptosporidium</i> sp.	Diarrea acuosa	¿Enterotoxina?	Intestino delgado	-
<i>Blastocystis hominis</i>		Desconocido	Intestino delgado/grueso	-

ECET: *Escherichia coli* enterotoxigénica; **ECEP:** *Escherichia coli* enteropatógena; **ECEH:** *Escherichia coli* enterohemorrágica; **ECEI:** *Escherichia coli* enteroinvasiva; **PMN:** Leucocitos polimorfonucleares; **GR:** Glóbulos rojos.

Tomado de: Vizcaya y col, 1999; Romero y Herrera, 2002; Ryan y Ray, 2004.

Coprocultivo

Etapas pre-analíticas

Muestra: La muestra de heces o hisopado rectal debe ser recolectada durante el período agudo de la enfermedad, antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. Utilizar un envase de boca ancha, tapa hermética, preferiblemente estéril, en caso de muestras líquidas se recomienda recolectarla en un envase para recolección de orina.

Conservación y transporte de la muestra: Si la muestra no se cultiva de inmediato, antes de las dos horas, se recomienda colocarla en un medio de transporte: Cary Blair y mantenerla a temperatura ambiente por un lapso no mayor a 5 días.

Datos clínicos y epidemiológicos del paciente: Edad, síntomas, tiempo de evolución del cuadro diarreico, tipo de alimentos ingeridos, contacto con animales y cuáles, procedencia, ocupación.

Etapa analítica

Examen directo

Examen macroscópico: consistencia, color, olor, presencia o ausencia de moco y/o sangre.

Examen microscópico: para determinar rápidamente la naturaleza de una enfermedad diarreica es de gran ayuda y tiene un alto grado de confiabilidad la *Investigación de leucocitos fecales*, que consiste en determinar el tipo de células inflamatorias presentes en las heces; esta información orienta sobre la naturaleza del proceso infeccioso, ejemplo, en la shigelosis hay abundancia de neutrófilos polimorfonucleares.

Detección de leucocitos fecales

1. Colocar una pequeña cantidad de moco o de heces en una lámina y mezclar con 2-3 gotas de azul de metileno al 1%.
2. Cubrir con una laminilla y esperar 2 a 3 minutos con la finalidad de obtener una buena coloración nuclear.
3. Observar al microscopio con los objetivos secos (10X y 40X).

Nota: También se puede realizar un frotis y colorearlo con una coloración simple o compuesta.

Interpretación

La presencia de 5 o más leucocitos por campo microscópico sugiere la presencia de un agente enteroinvasor. La ausencia de células inflamatorias sugiere la presencia de un agente toxigénico (Tabla 17).

Aislamiento bacteriano

En las muestras de heces, las bacterias entéricas patógenas se encuentran siempre asociadas a una gran variedad de bacterias comensales, es por ello, que para facilitar el aislamiento y posterior identificación de estas bacterias, se emplean diferentes medios de enriquecimiento, selectivos y selectivos diferenciales (Fig. 15).(1)

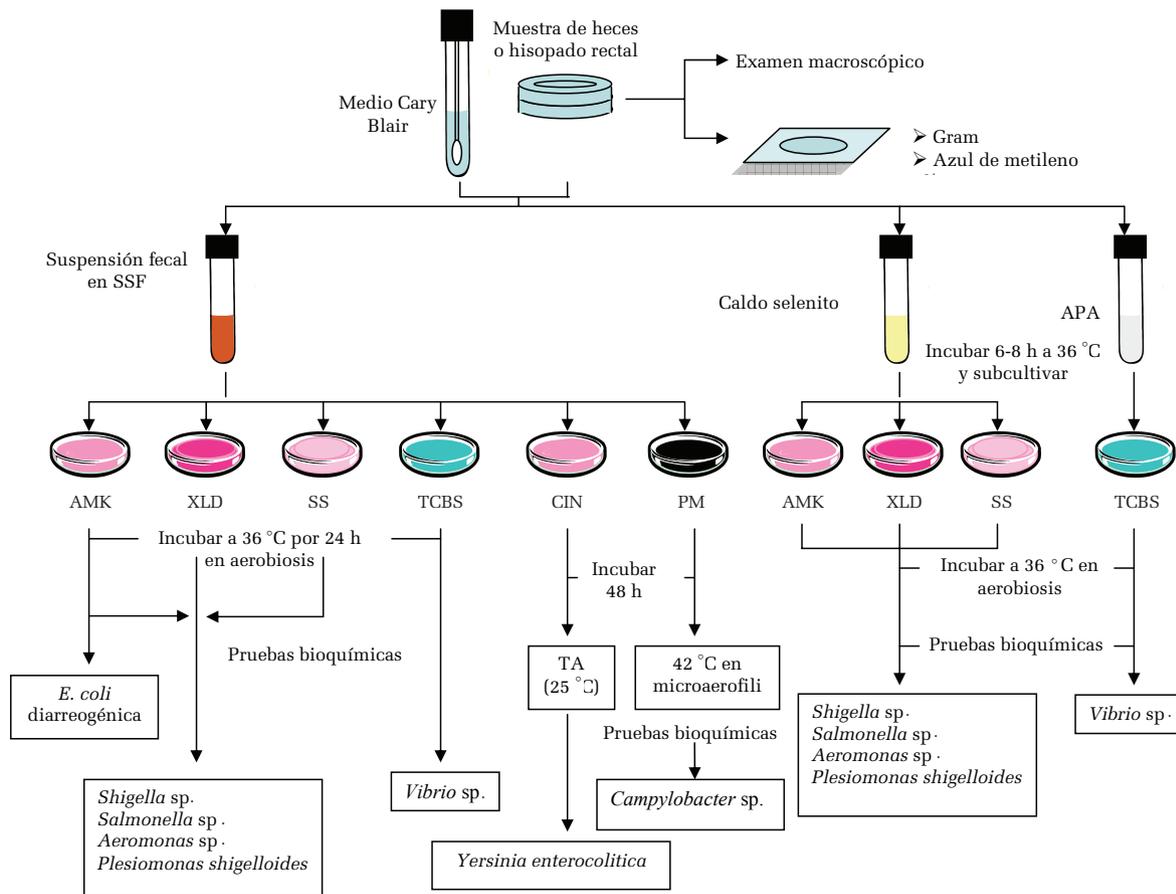


Figura 15. Coprocultivo

Medios selectivos y selectivos diferenciales

La muestra completa (Suspensión fecal en solución salina fisiológica) o conservada en Cary Blair se siembra en los medios agar MacConkey (MK), agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), agar salmonella-shigella (SS), agar cefsulodin-irgasan-novoviocina (CIN), agar desoxirribonucleico-ampicilina (ADN-AMP), agar tiosulfato-citaro-sales biliares (TCBS) y agar preston modificado (PM). Todos los medios a excepción del CIN y PM, son incubados a 36 °C durante 24 horas y luego a temperatura ambiente por 24 horas más. Los medios CIN y PM se incuban durante 48 horas a temperatura ambiente (25 °C), 42 °C y en microaerofilia, respectivamente.(1)

Medios de enriquecimiento: Se utiliza el caldo selenito (para enterobacterias) y agua peptonada alcalina (APA) pH 8,4, para *Vibrio*, los cuales después de transcurridos 6-8 horas de incubación a 36°C, del caldo selenito se toma una muestra con el asa en aro de la parte más superficial del caldo y se inoculan los medios agar MK, XLD y SS, y del mismo modo a partir del APA al agar TCBS, luego estos medios se incuban en las condiciones anteriormente señaladas.(1)

Identificación

Escherichia coli diarreogénicas:

Se investigan cuatro tipos: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterotoxigénica productora de la toxina termolábil (ECET-TL), *E. coli* enterohemorrágica O:157 H:7 (ECEH). Para ello se seleccionan del agar MK, de la siembra directa con la materia fecal, 5 colonias fermentadoras de la lactosa sugestivas de *E. coli*, las colonias seleccionadas se identifican como *E. coli* mediante las pruebas de: oxidasa, Kligler, Indol-motilidad, citrato. A esta bioquímica inicial se le adiciona el medio lisina-hierro-agar (LIA), cuando se sospecha de ECEI (particularmente cuando el recuento de leucocitos es superior a 5 x campo microscópico), la cual no decarboxila la lisina. Cuando se sospecha de ECEH serotipo O:157 H:7, se adiciona caldo sorbitol, la cual no fermenta el sorbitol, también se recomienda el uso de agar MK con sorbitol para la recuperación de este serotipo (Fig. 16).(1)

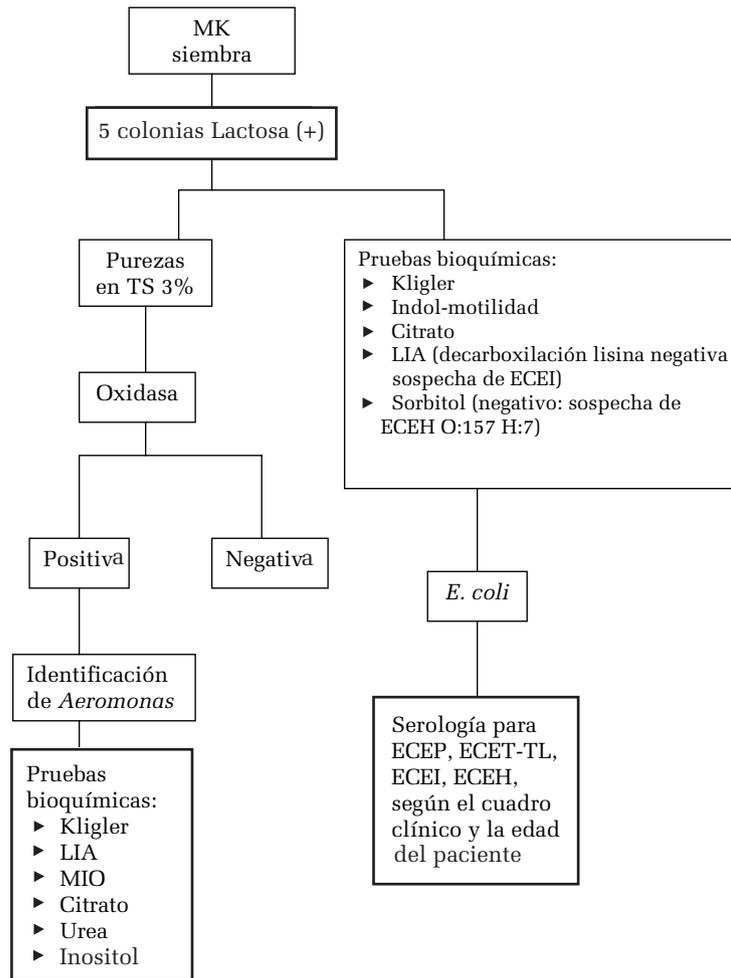


Figura 16. Investigación de *Escherichia coli* diarreogénicas

Luego en el caso de ECEP, ECEI y ECEH, se procede a realizar la identificación serológica, utilizando antisueros comerciales anti “O” y la determinación de la toxina termolábil en el caso de ECET-TL.

En la actualidad, la identificación definitiva de estas categorías de *E. coli* se realiza mediante técnicas de biología molecular, detectando genes que codifican fundamentalmente factores de virulencia.

Géneros *Salmonella* y *Shigella*: La recuperación e identificación de estos géneros, se realiza seleccionando colonias no fermentadoras de la lactosa de los medios MK, XLD y SS, de la siembra directa y a partir de la siembra en estos medios del caldo selenito. También se seleccionan como colonias sospechosas de *Salmonella*, las no fermentadoras de la lactosa y con producción de H₂S que han desarrollado en los medios XLD y SS (Fig. 17). La identificación bioquímica se realiza mediante las pruebas de oxidasa, kligler, LIA, motilidad-indol-ornitina (MIO), citrato, urea y otras que se consideren necesarias (Anexo 15, 16, 17).(1,6)

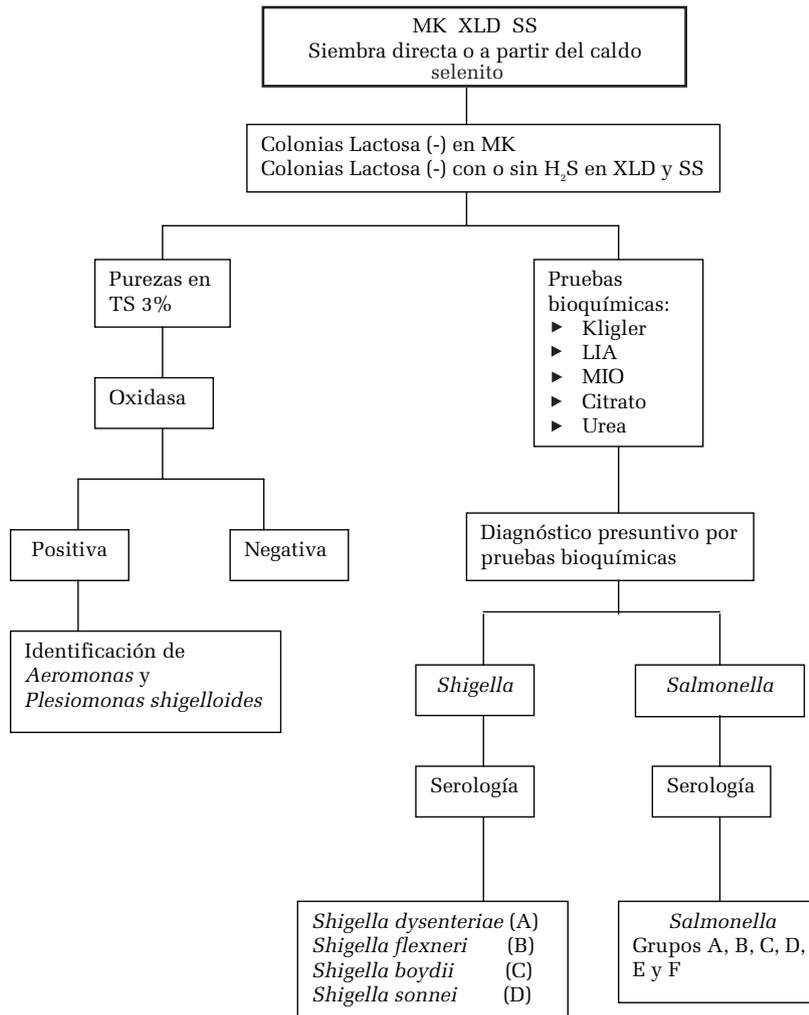


Figura 17. Investigación de *Shigella* y *Salmonella*

La identificación serológica se realiza con antisueros polivalente anti "O" para los grupos A, B, C y D en el caso de *Shigella* y antisueros anti "O" para los grupos A,B, C, C1-2, D, E y F en el género *Salmonella*.

Género *Yersinia*: Se investiga fundamentalmente en el medio CIN. Después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente (22 °C), se seleccionan colonias fermentadoras del manitol, la identificación bioquímica se realiza mediante las pruebas de: oxidasa, kligler, urea, motilidad a 36 y 22 °C (Fig. 18).(1,6)

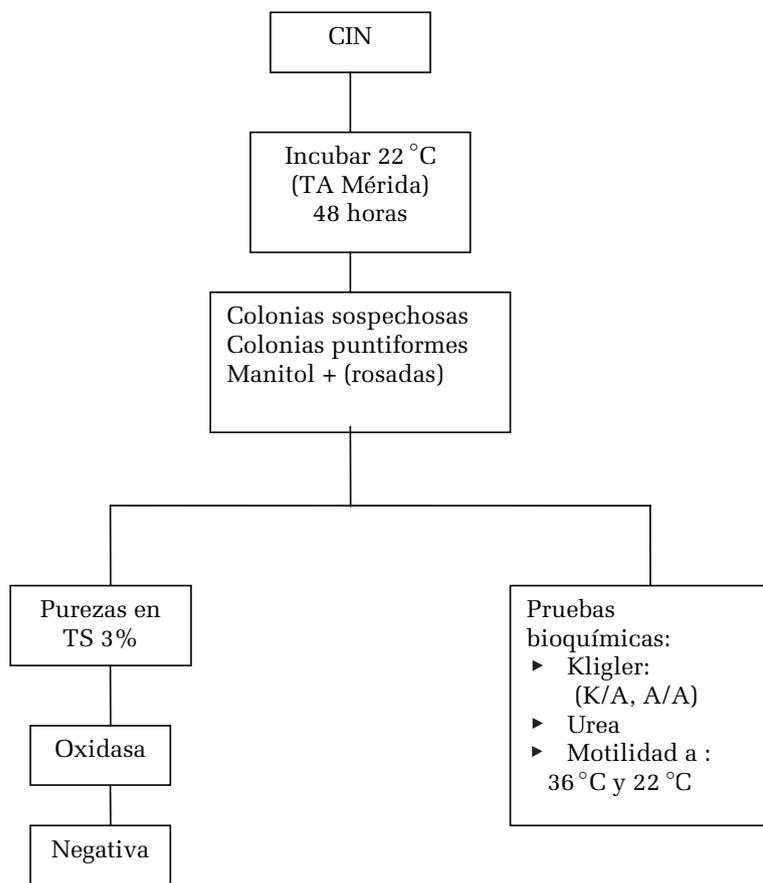


Figura 18. Investigación de *Yersinia enterocolitica*

Género *Aeromonas* (Fig. 16, 17): La búsqueda de este género bacteriano se realiza en los medios MK, XLD, y SS, sembrados directamente con la materia fecal o a partir del caldo selenito. En algunas oportunidades se puede recuperar del agar TCBS. En los primeros medios se recupera como una colonia no fermentadora de la lactosa, pero algunas especies son fermentadoras de este carbohidrato. Del medio TCBS, puede aislarse como fermentadora o no de la sacarosa. En el caso del ADN-AMP, la búsqueda se facilita porque además del carácter selectivo del medio, la mayoría de las cepas hidrolizan el ADN, lo cual se evidencia por el viraje del indicador de pH azul de toluidina, de azul a

rosado. La identificación bioquímica se realiza mediante las pruebas de oxidasa (positiva), fermentación de glucosa y se debe realizar la diferenciación con el género *Vibrio* y *Plesiomonas shigelloides* (Anexo 15, 16, 17).

***Plesiomonas shigelloides*:** Se investiga en los medios MK, XLD y SS de la siembra directa o a partir del caldo selenito (Fig. 17). Se seleccionan colonias no fermentadoras de la lactosa que deben ser positivas a las pruebas de oxidasa y fermentación de la glucosa; al igual que en el género *Aeromonas*, realizar diferenciación con los géneros relacionados (Anexo 15, 16).

***Vibrio cholerae*:** Del medio TCBS de la siembra directa o a partir del APA, se seleccionan colonias fermentadoras de la sacarosa (Fig. 19). Con la coloración de Gram de las colonias sugestivas se confirma que sean bacilos gramnegativos para continuar la identificación. Luego se comprueba que sean oxidasa positiva, fermentadoras de la glucosa, no productoras de gas, crecimiento en caldo nutritivo con cloruro de sodio 1% pero no al 6,5%. Se deben realizar otras pruebas bioquímicas para diferenciar a *V. cholerae* de otros géneros relacionados (Anexo 15, 16).

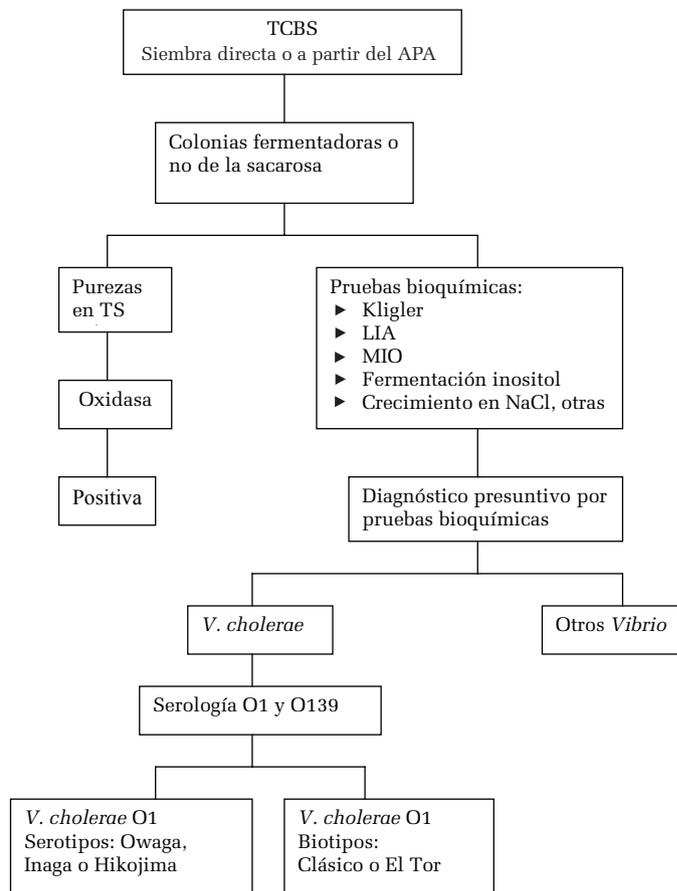


Figura 19. Investigación de *Vibrio*

Luego se realiza la tipificación serológica, con antisueros “O1” y “O139”. En el caso de “O1”, se debe realizar la serotipificación para determinar si es el serotipo Owaga o Inaba, y la biotipificación si se trata del biotipo Clásico o El Tor (Anexo 20). En los laboratorios de referencia se debe determinar si la cepa aislada es productora o no de la toxina termolábil.

***Campylobacter* sp.:** A partir del medio PM, después del período de incubación durante 48 horas a 42 °C en microaerofilia (frasco con la vela), se investigan las campylobacterias termotolerantes, las colonias sospechosas son de color gris, brillantes, con aspecto de gota de agua, algunas pueden seguir la línea de siembra, adherentes, a las cuales se les practica una coloración de Gram con el fin de observar bacilos gramnegativos curvos, en forma de coma o con apariencia de alas de gaviota. La identificación de las especies más involucradas en trastornos diarreicos se realiza mediante la prueba de oxidasa (positiva) y las descritas en la Figura 20.

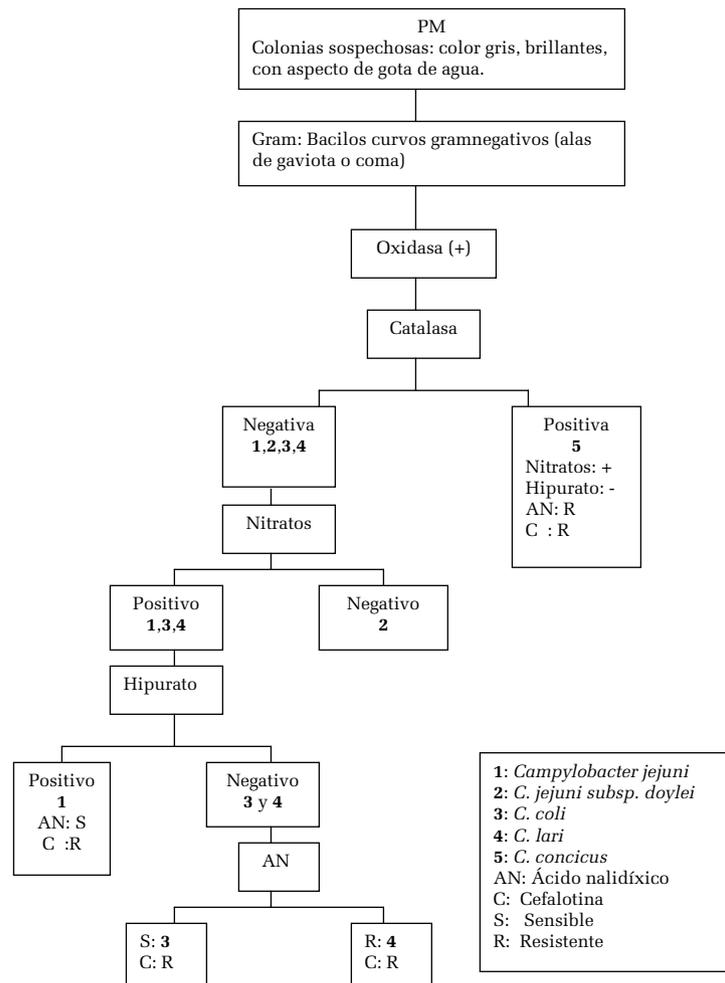


Figura 20. Investigación de *Campylobacter* sp., especies más asociadas a problemas diarreicos

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para el tratamiento específico se realizan en los siguientes casos:

- a) Fiebre tifoidea causada clásicamente por *S. typhi*, sin embargo, otras salmonelas como *S. paratyphi* A, B, *S. choleraesuis* producen cuadros clínicos similares.
- b) Síndrome disentérico: los agentes asociados son diversos: *Shigella* sp., ECEI, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas* sp., *Plesiomonas shigelloides*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus* entre otros. Se recomienda tratamiento específico para *Salmonella* sp. en el caso de menores de un año o cuando se sospeche de infección extraintestinal.
- c) Diarrea crónica o persistente que puede ser causada por *C. jejuni*, *Salmonella* sp. y ECEP.
- d) Cólera: producido por *V. cholerae* O1 y O139. El tratamiento no cura la enfermedad, pero acorta el volumen y duración de la diarrea y reduce el período de excreción del *Vibrio*. Se recomienda sugerir al médico tratante realizar un estudio de control post-tratamiento.

Etapa post-analítica

Informe de resultados

Datos personales del paciente: Nombre y apellidos, cédula de identidad.

Nombre del médico tratante

Fecha de recepción de la muestra y emisión del reporte.

Tipo de muestra: Heces completas o hisopado rectal

Examen realizado: Coprocultivo o cultivo y antibiograma

Resultados del examen directo: fresco o frotis: Azul de metileno al 1% o Gram: Observación o no de leucocitos mononucleares o polimorfonucleares (cantidad x campo microscópico).

Agente microbiano aislado (género y especie):

Antibiograma: Solo se debe realizar en aquellos casos que se mencionaron anteriormente.

Observaciones: Mencionar solo los microorganismos investigados.

8 Actividad práctica

Coprocultivo

Primer período

Materiales

- Muestra de heces
- Medios de cultivo: Cary Blair, Caldo Selenito, APA, agar MK, XLD, SS, TCBS, PM, CIN.
- Azul de metileno al 1%
- Solución salina fisiológica (SSF)
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- Coloración de Gram

Procedimiento

1. Llenar la planilla de registro del laboratorio con los datos personales, epidemiológicos y clínicos del paciente.
2. Realizar el examen macroscópico y microscópico (leucocitos fecales) de una muestra de heces y describir lo observado en cada caso.
3. Preparar una suspensión fecal en SSF y sembrar con pipeta Pasteur en los diferentes medios selectivos-diferenciales, selectivos y de enriquecimiento, diseminar por agotamiento en las placas de agar e incubar en las condiciones ya señaladas (Fig.16).

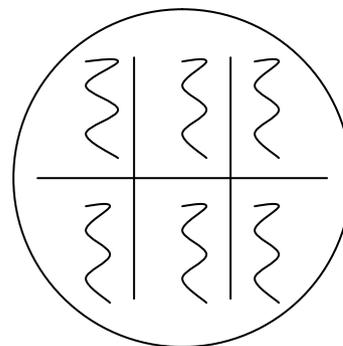
Segundo período

Materiales

- Agar Tripticasa Soya (TS) al 3%
- Pruebas bioquímicas: Kligler, LIA, MIO, IM, Urea, Cit

Procedimiento

1. Observar las placas sembradas en el período anterior, describa las características observadas en cada medio y seleccione las colonias de interés, realizar la purificación correspondiente en agar TS 3%, inocular las pruebas bioquímicas según el caso, incubar a 37 °C en aerobiosis durante 12-18 horas.



Tercer período

Materiales

- Reactivo de oxidasa
- Reactivo de Kovacs
- Papel de filtro y palillos de madera
- Antisueros
- Agar Mueller Hinton
- Patrón de MacFarland
- Hisopos estériles
- Discos de antibióticos

Procedimiento

1. Realizar la prueba de oxidasa de las colonias purificadas y ubicar la bacteria según el resultado obtenido, utilizando el anexo 15.
2. Realizar la lectura de las pruebas bioquímicas montadas en el período anterior e identificar la(s) bacteria(s) presente(s), utilizando las tablas y esquemas.
3. Realizar las pruebas serológicas en caso necesario.
4. Realizar el antibiograma si el caso lo amerita, de lo contrario realizar el reporte

Cuarto período

Realizar la lectura del antibiograma

Etapas post-analíticas

Realizar el reporte del resultado (Anexo 2)

Autoevaluación

1. Mencionar en orden de frecuencia los microorganismos productores de EDA.
2. Señalar las condiciones de conservación y transporte de una muestra de heces para coprocultivo.
3. Mencionar la importancia del examen directo de una muestra de heces en el coprocultivo.
4. Explicar la utilidad de cada uno de los medios utilizados en el coprocultivo.
5. Explicar la importancia de la etiología y patogenia en el diagnóstico microbiológico de la EDA.

Bibliografía

- (1) Vizcaya, L. En Araque M, Nieves B, Sánchez K, Velásquez A, Velasco E, Vizcaya L. Manual práctico de bacteriología. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia, Escuela de Bioanálisis, Departamento de Microbiología y Parasitología, Cátedra de Bacteriología Clínica. 1.999.
- (2) Ryan K, Ray C. Sherris, Microbiología médica. 4ª ed. México: Mc Graw–Hill Interamericana; 2004.
- (3) Cheng A, McDonald J, Thielman N. Infectious diarrhea in developed and developing countries. J Clin Gastroenterol 2005; 39(9): 757-773.
- (4) Delgado A, Amich S, Prieto S, Salve M. Manual de laboratorio clínico básico: Microbiología. Colombia: McGraw Hill; 2000.
- (5) Romero R, Herrera I. Síndrome diarreico infeccioso. España: Editorial Médica Panamericana; 2002.
- (6) Montiel F, Lam M. Manual de microbiología clínica. Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo; 2001.
- (7) Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Escuela de Medicina “Luis Razetti”, Cátedra de Microbiología. Guía de trabajos prácticos, Caracas, 2000.
- (8) Vizcaya L, Bravo L, Fonte L, Velasco J, Flores A. Diagnóstico de laboratorio de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). Curso teórico-práctico. Sociedad Venezolana de Microbiología, Capítulo de Mérida. XXII Jornadas Venezolanas de Microbiología “Dr. José A. Serrano”. Mérida–Venezuela. 1994.
- (9) Castro G, Aguilera M, Hernández C, Arteaga R, Carmona A, Pérez A, Giono S, Figueras M, Aparicio G. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. Bioquímica 2003; 28(4): 11-18.
- (10) Velasco J, Vizcaya L, Nieves B, Pérez I, Carrero A, Hernández J, Sánchez K. Campilobacterias termotolerantes como causa de enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños merideños. Revista de la Facultad de Farmacia 2001; 42: 47- 54.

práctica 9

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del aparato circulatorio. Hemocultivo

Elsa Velazco

Objetivo general

Determinar mediante el hemocultivo el diagnóstico microbiológico de una infección del aparato circulatorio.

Objetivos específicos

1. Reconocer y aplicar los pasos a seguir en la toma adecuada de muestra de sangre para la realización del hemocultivo.
2. Aplicar las técnicas microbiológicas convencionales para el aislamiento e identificación de bacterias involucradas en infecciones del aparato circulatorio.
3. Determinar el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de las bacterias aisladas en sangre.

Aspectos teóricos

El aparato circulatorio, es un sitio naturalmente estéril, por lo tanto, la presencia de microorganismos o sus productos (ej: toxinas) constituyen un problema para todos los órganos y sistemas que son irrigados por el mismo.(1) La detección e identificación de los diversos agentes microbianos, es de vital importancia desde el punto de vista clínico y epidemiológico. Desde el punto de vista clínico, ofrece información necesaria para instaurar una terapia antimicrobiana adecuada, así como para establecer el pronóstico del paciente; y desde el punto de vista epidemiológico, permite registrar la etiología, la frecuencia y el tipo de población afectada por estas infecciones a nivel local, lográndose establecer e implementar medidas de prevención y control específicas en las mismas.

Se han descrito diferentes tipos de infecciones en el aparato circulatorio, tales como: (2,3,4)

- **Bacteremia:** Presencia de bacterias en la sangre. De acuerdo a su origen se clasifican en primarias y secundarias.

Bacteremia primaria: Ausencia de foco primario de infección.

Bacteremia secundaria: Existe una asociación clínica, temporal y bacteriológica con un sitio reconocido de infección en el paciente. Los sitios de origen más frecuentes son: infecciones genitourinarias, pulmonares, endovasculares, intraabdominales, de heridas quirúrgicas y cutáneas. Cabe destacar, que las bacteremias asociadas con complicaciones de terapias intravenosas, como celulitis y tromboflebitis, se consideran bacteremias secundarias.

- **Fungemia:** Presencia de hongos en la sangre.
- **Septicemia:** Es un conjunto de alteraciones fisiológicas resultante de la presencia de los microorganismos (Tabla 18) o sus productos en el torrente sanguíneo o en los tejidos, con capacidad de producir invasión e infecciones a distancia. Actualmente se considera como una respuesta sistémica a una infección, esta respuesta se manifiesta por dos o más de los siguientes parámetros como resultado de una infección: temperatura mayor de 38 °C o menor de 36 °C, ritmo cardíaco mayor de 90 latidos por minuto, ritmo respiratorio mayor de 20 respiraciones por minuto o pCO₂ menor de 32 mm Hg, recuento leucocitario mayor de 12.000 células por mL³ o mayor del 10% de formas inmaduras (en banda). El progreso de la enfermedad se denomina choque (shock) séptico.
- **Choque (shock) séptico:** Sepsis con hipotensión, a pesar de una reanimación adecuada con líquidos el paciente no responde, además se observa alteración de la perfusión orgánica, que puede incluir disminución del gasto urinario, cambios del estado mental, acidosis sistémica e hipoxemia.
- **Infecciones endovasculares:** Consisten en infecciones localizadas en el torrente intravascular, incluido el corazón y los grandes vasos con o sin la presencia de prótesis como válvulas, injertos o parches, así como sitios de acceso intravenoso periférico, central y para hemodiálisis.

De acuerdo a estas definiciones se entiende que el ambiente hospitalario es el lugar donde se concentra el mayor número de este tipo de infecciones, no excluyendo cifras importantes de bacteremias en la comunidad (ej: zonas endémicas de brucelosis humana).(3,5)

La etiología microbiana de este tipo de infecciones está influenciada por varios factores: edad, procedimiento médico y órgano comprometido en el paciente⁵. En general, de los microorganismos involucrados, las bacterias gramnegativas, ocupan el primer lugar, representadas por las enterobacterias, seguidas de especies de estafilococos (*S. aureus* resistente a la meticilina y *Staphylococcus coagulasa negativa*), enterococos y especies de *Candida*. Ocasionalmente pueden presentarse micobacterias, rickettsias y virus como agentes etiológicos.(1)

Mundialmente, la septicemia bacteriana nosocomial constituye una de las enfermedades infecciosas más graves ya que su mortalidad oscila entre el 40 y el 60% de los casos.(3) Es por ello que la detección e identificación bacteriana es una de las funcio-

nes más importantes del laboratorio de microbiología y para ello se necesita establecer pautas a seguir desde la toma de muestra y su transporte para garantizar un análisis y reporte de resultados veraces.

En el caso de las bacteremias y septicemias es necesario el cultivo de sangre así como en las infecciones endovasculares el cultivo de la punta de catéter para el diagnóstico microbiológico de los mismos.(1)

Existen varios métodos para el cultivo y/o detección de microorganismos en sangre: métodos manuales cuantitativos, semicuantitativos (isolator) y cualitativos. Por otra parte, existen métodos automatizados, los cuales permiten un monitoreo continuo de la muestra mediante la incorporación de un método de detección, incubador y un mecanismo de agitación, lo cual optimiza el estudio microbiológico.(6,7)

Tabla 18. Sepsis. Microorganismos según el foco de origen

<p>Terapia endovenosa</p> <p>Sistema de infusión contaminado</p> <p>Catéter infectado</p> <p>Fluidos intravenosos contaminados</p> <p>Nutrición parenteral</p> <p>Sangre y derivados contaminados</p>	<p><i>Serratia, S. epidermidis, S. aureus, Klebsiella</i></p> <p><i>Enterobacter, Serratia, Enterococcus, Candida</i></p> <p><i>Enterobacter, Klebsiella</i></p> <p><i>Candida, enterobacterias</i></p> <p><i>Enterobacter, Salmonella.</i></p>
<p>Aparato circulatorio</p>	<p><i>Pseudomonas, Serratia, enterobacterias,</i></p> <p><i>S. aureus, S. pneumoniae.</i></p>
<p>Aparato digestivo</p> <p>Intestino grueso</p> <p>Hepato biliar</p> <p>Peritonitis espontánea</p>	<p><i>B. fragilis, E. coli, Enterobacter, Klebsiella, Enterococcus,</i></p> <p><i>Clostridium</i> y cocos anaeróbicos</p> <p><i>E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Enterococcus, Serratia</i></p> <p><i>E. coli, S. pneumoniae, Listeria monocytogenes.</i></p>
<p>Sistema cardiovascular</p> <p>Endocarditis</p> <p>Injertos vasculares</p>	<p><i>S. grupo viridans, Enterococcus, S. aureus, S. epidermidis,</i></p> <p>enterobacterias.</p> <p><i>S. epidermidis, S. aureus, E. coli, Klebsiella, Serratia,</i></p> <p><i>Salmonella.</i></p>
<p>Aparato genitourinario</p> <p>Infección urinaria</p> <p>Enfermedad inflamatoria pélvica</p>	<p><i>E. coli, Klebsiella, Proteus, Enterococcus, Pseudomonas.</i></p> <p><i>B. fragilis. Peptostreptococcus, Clostridium, N. gonorrhoeae,</i></p> <p><i>Streptococcus</i> del grupo B</p>
<p>Paciente inmunodeprimido</p>	<p><i>Pseudomonas, E. coli, Candida, S. aureus, Aspergillus.</i></p>

Tomado de: Martínez, 1996.

En el trabajo práctico, desarrollaremos el método manual cualitativo, por ser más económico manteniendo sensibilidad y especificidad aceptables en el diagnóstico microbiológico de este tipo de infecciones.

Se hará referencia al método de rodamiento en placa útil para el cultivo de punta de catéter, el cual permanece como método de referencia para la investigación de microorganismos asociados a los diversos procesos infecciosos mencionados en esta práctica.

Hemocultivo (8)

Toma de muestra de sangre

El momento ideal para la toma de muestra es durante el ascenso de la curva febril, sin esperar que se presente el pico máximo de temperatura, ya que en este momento hay mayor destrucción de los microorganismos.(9)

1. Seleccionar el sitio. Seleccionar los posibles sitios de los cuales se pueda obtener la muestra. Es importante destacar que cada sitio de venopunción representa un hemocultivo, independientemente del número de frascos que se inoculen.
2. Preparación del sitio para la venopunción. Lavar vigorosamente con agua y jabón. Limpiar con alcohol etílico o isopropílico al 70%. Si el paciente no es alérgico al yodo, lavar en forma concéntrica con tintura de yodo por 30 segundos con solución de yodopovidona por un minuto. Si existe alguna duda después de la preparación el personal entrenado sólo podrá palpar con guantes estériles.
3. Desinfectar las tapas de las botellas para el hemocultivo con alcohol o yodo.
4. Proceder a la venopunción con la jeringa en un ángulo no mayor de 45°, extraer el volumen de sangre necesario para obtener una dilución en una proporción de 1:5 o 1:10 de acuerdo al volumen y número de medios de cultivo a utilizar.
5. Dispensar el volumen de sangre obtenido rápida y suavemente en el medio de cultivo líquido con anticoagulante, previo al flameo con el mechero del orificio del envase que contiene el medio de cultivo.
6. Limpiar con alcohol al 70% para remover el yodo el cual puede causar irritación en algunos pacientes.

Transportes de muestras: Los medios de cultivos deben ser transportados inmediatamente al laboratorio evitando una agitación vigorosa.

Incubación de los medios: Deben ser incubados en aerobiosis y anaerobiosis a una temperatura de 36 °C por un período máximo de 7 días (para detalles del cultivo anaeróbico referirse a la práctica correspondiente). La metodología a seguir en el diagnóstico microbiológico de bacteremia y septicemia por hemocultivos se detalla en la Figura 21 y la Tabla N° 19.

Tabla 19. Aspectos a considerar en un hemocultivo	
Población	Pacientes con fiebre o con hipotermia que pertenezcan a grupos de alto riesgo.
Toma de muestra	Personal entrenado. Normas de bioseguridad.
Volúmen de la muestra	Neonatos 0,5 mL. Niños 1-5 mL y adultos 10 a 30 mL. Todas por venopunción.
Número de cultivos	2 muestras con antecedentes de patógenos no comunes. 3 muestras en caso de endocarditis u otra infección endovascular 4 o más si se aislan bacterias de la microbiota habitual. (<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>)
Intervalos de las muestras	Pacientes graves: 10 a 15 minutos. Pacientes estables: 1 hora o más.
Medios de cultivo	Caldo SDC (Soya Caseína Digestiva) y caldo BHI más peptona, para la recuperación de hongos y bacterias. Caldo Columbia+Peptona (anaerobios) Caldo Trypticase Soya Caldo Tioglicolato Sistema bifásico Septi-check.
Anticoagulante	SPS (Polianetosulfonato de sodio): <ul style="list-style-type: none"> • Inhibe isoenzimas • Inactiva antibióticos • Inhibe la fagocitosis • Su efecto inhibitorio puede ser contrarrestado por la gelatina al 1,2%. • SAS (Amilato Sulfato de Sodio) • Inhibe algunas bacterias aeróbicas y anaeróbicas.
Interpretación de resultados	Tomar en cuenta el tipo de proceso infeccioso de base, el número de cultivos y el agente etiológico identificado considerando la microbiota habitual del hombre.

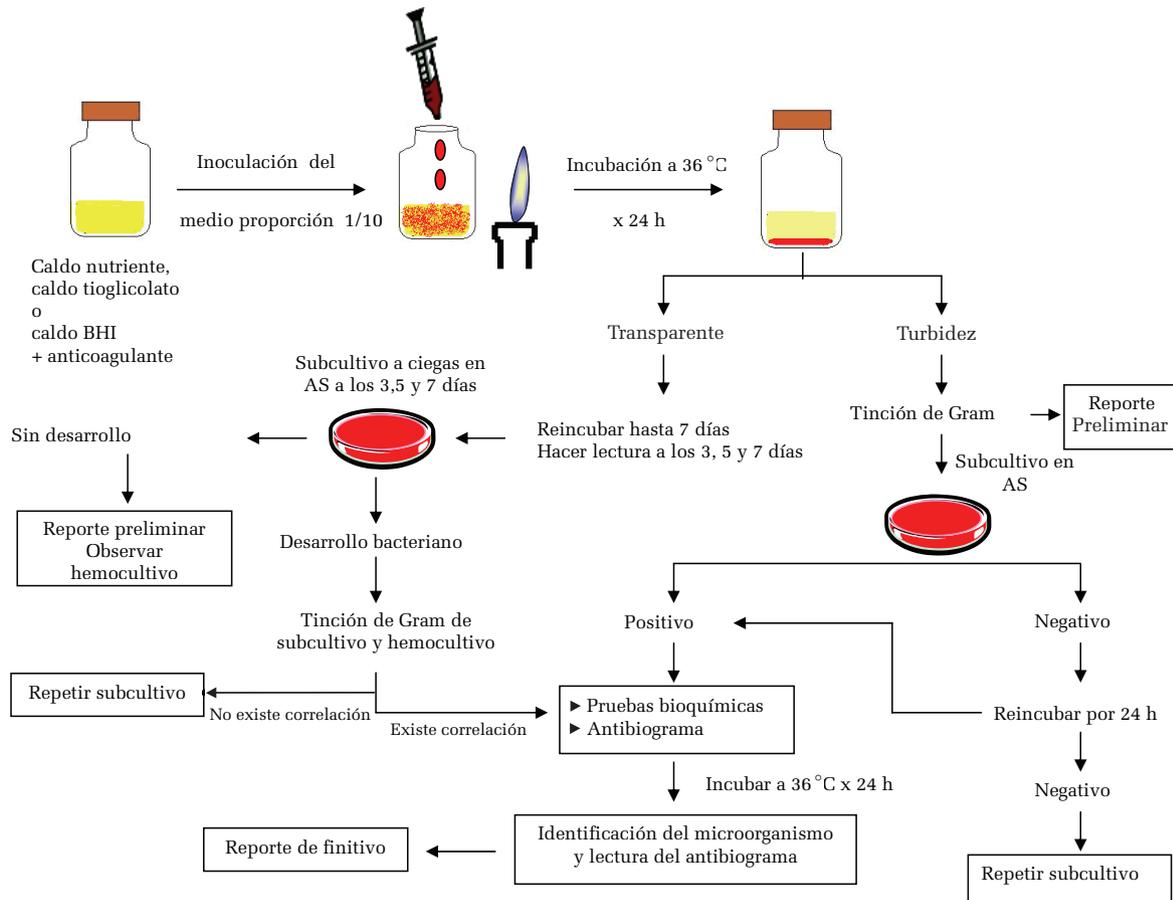


Figura 21 . Diagnóstico microbiológico de bacteremia y septicemia por hemocultivo

Cultivo de catéteres en infecciones endovasculares

El cultivo de catéteres asociados a infecciones endovasculares son útiles cuando un paciente bajo terapia endovenosa desarrolla fiebre o bacteremia sin un foco infeccioso clínicamente aparente. Para ello Maki y col, 1967 citado en ¹ introdujeron un método semicuantitativo de cultivo de los catéteres el cual puede ser útil para distinguir entre una contaminación o infección microbiana. El método consiste en los siguientes pasos:

1. Realizar una antisepsia cuidadosa del sitio de inserción y retirar el catéter.
2. Cortar con técnica estéril a 4 ó 5 cm del extremo del catéter.
3. Colocar la punta en un tubo estéril para ser enviada al laboratorio.
4. Una vez en el laboratorio se procede a inocular mediante rodamiento en una placa de agar sangre la punta del catéter.
5. La placa de agar sangre debe ser incubada en microaerofilia a una temperatura de 36°C durante un máximo de 72 horas con lecturas intermedias cada 24 horas.

6. Después de la incubación, realizar conteo del número de colonias bacterianas y si el número de colonias en la placa es igual o mayor de 15, la posibilidad de septicemia con este punto de origen es alta.
7. Identificación de los microorganismos aislados mediante la realización de la coloración de Gram y pruebas bioquímicas diferenciales.
8. Realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de acuerdo al microorganismo identificado.

9 Actividad práctica

Etapa pre-analítica

1. Seleccione los datos clínicos y epidemiológicos a considerar en una bacteremia o septicemia de la solicitud del médico tratante.
2. Registre los datos del paciente en la hoja de consumo interno del laboratorio diseñada para tal fin.

Etapa analítica

Primer período

Materiales

- Torniquete
- Guantes, algodón y gasa estériles
- Tapaboca
- Mechero
- Alcohol etílico o isopropílico al 70%
- Agua jabonosa
- Yodo o solución de yodopovidona
- Jeringa de aguja de 21 x 1 1/2
- Frascos o tubos con tapa de rosca con caldo BHI (con anticoagulante).

Procedimiento

Realizar la toma de muestra de sangre, transporte e incubación de los medios de cultivo de acuerdo a lo descrito previamente.

Segundo período

Materiales

- Láminas porta y cubreobjeto
- Equipo de coloración de Gram
- Asa de platino, pipetas Pasteur estériles
- Agar Tripticasa Soya.
- Agares: Sangre y Chocolate (para muestras de origen comunitario).
- Agares: Sangre, McConkey y agar Manitol Salado (muestras de origen hospitalario).

Procedimiento

Observar el aspecto del hemocultivo (transparente o turbio) y de acuerdo a ello seguir la metodología descrita en la figura 21.

En la realización del frotis para la coloración de Gram es importante considerar:

1. Se debe abrir cuidadosamente el recipiente cerca del mechero, introducir el asa de platino en anillo previamente esterilizada por el calor directo de la llama o en su defecto utilizar una pipeta Pasteur estéril con el propósito de minimizar el riesgo de contaminación del medio.
2. Colocar la gota del líquido y dejarla secar al aire sin esparcirla por la lámina portaobjeto. El propósito es concentrar el mayor número posible de microorganismos presentes en el volumen de muestra tomada.
3. Si en la coloración de GRAM se observa morfología bacteriana se debe realizar un reporte preliminar y notificarlo inmediatamente al médico tratante.

Tercer período

Materiales

- Equipo para la coloración de Gram
- Papel de filtro
- Palillos de madera
- Reactivos de oxidasa y catalasa
- Pruebas bioquímicas

Procedimiento

1. Observar el desarrollo bacteriano en los diferentes medios de cultivo utilizados.
2. Realizar la coloración de Gram.
3. Realizar la prueba de la oxidasa o catalasa del agar tripticasa soya
4. De acuerdo a las pruebas de identificación preliminares, seleccionar e inocular en los medios de cultivo diferenciales para la identificación bacteriana definitiva.

Cuarto período

Materiales

- Hisopos estériles
- Patrón 0,5 y 2 de Mac Farland
- Reactivos: Kovas y tricloruro férrico.
- Discos de antibióticos
- Agar Mueller-Hinton (MH), MH con 2% de cloruro de sodio, MH con 5% de sangre.

Procedimiento

Realizar la lectura de los medios de cultivo diferenciales para la identificación bacteriana (ver anexos). De acuerdo al microorganismo aislado seleccionar el tipo de agar MH y los discos de antibióticos para realizar el antibiograma (ver práctica de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana).

Quinto período

Materiales

- Regla milimetrada
- Tablas de la NCCLS para la interpretación de los halos de inhibición de los antibióticos ensayados (ver práctica de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana).

Procedimiento

Lectura de antibiograma e interpretación de los resultados obtenidos en todas las etapas del diagnóstico microbiológico.

Etapa post-analítica

Elaborar el reporte definitivo de los resultados (Anexo 2).

Autoevaluación

1. Establezca la diferencia entre un sitio anatómico naturalmente estéril y naturalmente contaminado
2. ¿Cuáles son los hallazgos clínicos y epidemiológicos que se deben considerar en una infección del aparato circulatorio de origen nosocomial?

3. Clasifique las metodologías para el diagnóstico microbiológico de una infección en el aparato circulatorio.
4. Explique los aspectos a considerar para un hemocultivo
5. Describa los pasos a seguir en la toma de muestra para un hemocultivo.
6. Explique la utilidad del reporte preliminar en el caso del hemocultivo.
7. Establezca la diferencia de un reporte de hemocultivo con reportes de muestras de urocultivo, coprocultivo e infecciones del tracto respiratorio superior.

Bibliografía

- (1) Martínez J. Infecciones sistémicas: Septicemia y endocarditis infecciosa. En: García Rodríguez y Picazo. Microbiología médica. (ed) Tomo 2. Ediciones Mosby/Doyma 1996. p. 131-152.
- (2) Stanford S., Phair J., Peterson, L., Warren J. Enfermedades infecciosas. Bases clínicas y biológicas. 5ª ed. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 1999. p. 526-542.
- (3) Nieto, J. Fisiopatología de la infección. En Infecciones intrahospitalarias. Malagón G., Hernandez E. 2ª ed. Colombia: Editorial Médica Panamericana; 1999. p. 61-74.
- (4) Reimer, L. Update on Detection of Bacteremia and Fungemia. Clin Microbiol Rev 1997; 10 (3): 444-465.
- (5) Wenzel. Current understanding of sepsis. Clin Infect Dis 1996; 22: 407-413.
- (6) Koneman E, Allen S, Dowell V, Janda W, Sommers H, Winn W. Diagnóstico microbiológico. 3ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1998. p.119-195.
- (7) Prescott L, Harley J, Klein D. Microbiología. 5ª ed. España: Editorial McGraw-Hill. Interamericana; 2004. p.852, 1012-1013.
- (8) Velazco E. Infecciones del Aparato Circulatorio. En Araque M, Nieves B, Sánchez K, Velásquez A, Velazco E, Vizcaya L. Manual práctico de bacteriología. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia, Escuela de Bioanálisis, Departamento de Microbiología y Parasitología, Cátedra de Bacteriología Clínica. 1.999.
- (9) Ballows A, Hausler W, Herrmann K, Isenberg H and Shadomy H. Manual of clinical microbiology. 5ª. ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1991.

práctica 10

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. Líquido Cefalorraquídeo (LCR)

María del Carmen Araque

Objetivos generales

Determinar mediante el cultivo del Líquido Cefalorraquídeo (LCR) el diagnóstico microbiológico de una infección del Sistema Nervioso Central (SNC).

Objetivos específicos

1. Conocer los pasos a seguir en la toma adecuada de muestras de LCR para la realización de estudios microbiológicos.
2. Analizar macroscópica y microscópicamente una muestra de LCR y realizar el reporte adecuado de este estudio.
3. Aplicar las técnicas microbiológicas convencionales para el aislamiento e identificación de bacterias involucradas en las infecciones del SNC.
4. Determinar el patrón de susceptibilidad de las bacterias aisladas en el LCR a los agentes antimicrobianos.
5. Elaborar y reportar correctamente los resultados del cultivo y el antibiograma de patógenos aislados en LCR.

Aspectos teóricos

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 urgente necesidad de instalar una terapia antimicrobiana eficaz cuando se identifica el agente infeccioso involucrado.

Las patologías infecciosas del SNC son variadas y pueden involucrar más de una estructura anatómica o tejido cerebral, es por ello que debemos realizar una revisión de algunos términos comúnmente utilizados:(1-3)

- **Meningitis:** Inflamación de las meninges, identificada por una cuantificación anormal de leucocitos en LCR y con manifestaciones clínicas dependientes de la evolución del cuadro clínico.
- **Encefalitis:** Inflamación o infección del tejido cerebral o ambos fenómenos, con o sin edema secundario.
- **Meningoencefalitis:** Inflamación o infección del cerebro o ambas alteraciones con afectación de las meninges.
- **Meningitis bacteriana:** Inflamación meníngea causada por una bacteria patógena presente en LCR. La infección provocada por *Mycobacterium tuberculosis* constituye una entidad particular denominada meningitis tuberculosa.
- **Meningitis aséptica:** Inflamación meníngea de causa diversa, sin evidencia de un microorganismo patógeno detectable en LCR, aplicando técnicas usuales de laboratorio.

Las infecciones del SNC pueden ser causadas por bacterias, virus, hongos o parásitos que se hallan en el medio ambiente o que forman parte de la flora normal de las superficies corporales (Tabla 20). Por lo general, en las infecciones del SNC los agentes causales son introducidos previamente en los tejidos periféricos del hospedero y se dirigen al SNC a través de la circulación sistémica como es el caso de agentes patógenos que colonizan el tracto respiratorio (ej: virus de la encefalitis equina), por las vías nerviosas (ej: virus de la rabia), o a través de la placenta (ej: virus de la rubéola). Otra forma de ingreso de los microorganismos en el SNC es por inoculación directa, ocasionado por los traumatismos craneoencefálicos (2,3).

TABLA 20. Causas frecuentes de infecciones purulentas del sistema nervioso central	
Grupo etario	Agente
Recién nacidos (< un mes de edad)	<i>Streptococcus</i> del grupo B, <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , especies de <i>Klebsiella</i> y otras enterobacterias.
Lactantes y niños	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> .
Adultos	<i>S. pneumoniae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>
Circunstancias especiales	
Meningitis o abscesos intracraneales vinculados con traumatismos, intervenciones neuroquirúrgicas o cuerpos extraños intracraneales.	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , bacterias anaerobias gramnegativas y grampositivas, especies de <i>Pseudomonas</i> .
Abscesos intracraneales no vinculados con traumatismos o intervención quirúrgica.	Estreptococos microarófilos o anaerobios, bacterias gramnegativas anaerobias y flora mixta.

Es importante destacar que en algunas infecciones los microorganismos están alojados en el SNC en un estado de “latencia”, tal es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* o *Treponema pallidum*. Estos agentes producen la enfermedad activa algún tiempo después o cuando las condiciones inmunológicas del huésped así lo permitan.

Aunque los abscesos del SNC son relativamente raros en comparación con otras infecciones del SNC, representan un problema microbiológico y clínico especial. Estos pueden hallarse en el interior de los tejidos del SNC o en los espacios subdural o epidural. Algunas veces son una complicación de la meningitis piógena. Más a menudo, los abscesos del SNC son producto de la embolización de bacterias u hongos desde un sitio distante infectado, como es el caso de la endocarditis bacteriana o el absceso pulmonar piógeno, extensión de un foco contiguo de infección (sinusitis o mastoiditis) o consecuencia de una complicación quirúrgica o traumatismo no quirúrgico.(3)

Las infecciones del SNC suelen tener consecuencias graves. La meningitis bacteriana no tratada, es letal en un 70% de los casos. Sin embargo, los avances en las diversas técnicas diagnósticas, así como el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos han reducido la mortalidad por estas enfermedades en un 10%. Por otro lado, algunas infecciones del SNC ocurridas durante la infancia dejan severas secuelas neurológicas que alteran el desarrollo mental y psicomotor del individuo.(1-3)

La infección aguda del SNC constituye un problema diagnóstico de gran **urgencia**. El examen del líquido cefalorraquídeo (LCR) es absolutamente necesario cuando se sospecha de infecciones agudas del SNC. La muestra de LCR se obtiene realizando una punción lumbar, la técnica debe ser realizada por el personal competente y bajo estrictas condiciones de asepsia, por lo tanto, todos los organismos recuperados de los cultivos son patógenos potenciales.(3,4)

Los elementos de la respuesta inflamatoria en el LCR son de gran ayuda para determinar si la infección es bacteriana o viral, incluso puede sugerir la presencia de un determinado agente infeccioso. En la tabla 21, se muestra el perfil inflamatorio reflejado en el LCR en diversas infecciones del SNC.

El cultivo del LCR es la forma clásica de establecer de manera definitiva la etiología y es útil para hacer la evaluación de la susceptibilidad a los diferentes agentes antimicrobianos. Sin embargo, existen otras técnicas para detectar la presencia del microorganismos en LCR, como la detección de antígenos específicos (búsqueda inmunológica) o la detección de células bacterianas no viables (técnicas moleculares). Estas pruebas permiten realizar un diagnóstico rápido, así como la detección de bajos niveles de antígenos, células muertas o material genético específico.(4)

TABLA 21. Patrón habitual del LCR y en diversas infecciones del SNC

Situación clínica	Leucocitos/mm ³	% polimorfonucleares	Glucosa ^a	Proteínas(mg/dl)
Niños y adultos				
Normal	0-5	0	≥ 60	≤ 30
Infección viral	2-2000 (80) ^b	≤ 50	≥ 60	30-80
Infección bacteriana	5-5000 (800)	≥ 60	≤ 45	≥ 60
Tuberculosis y micosis	5-2000 (100)	< 60	≤ 45	≥ 60
Recién nacidos				
Normales a término	0-32 (8)	≤ 60	≥ 60	20-170 (90)
Normales pretérmino	0-29 (9)	≤ 60	≥ 60	65-150 (115)

^a Los valores deben interpretarse de acuerdo a la glucosa en sangre.

^b Los números entre paréntesis representan cifras medias.

10 Actividad práctica

Estudio microbiológico del líquido cefalorraquídeo (Aislamiento de bacterias comunes)

Materiales

- Muestra de LCR a estudiar.
- Láminas portaobjeto.
- Equipo para coloración de Gram.
- Equipo para detección inmunológica (opcional).
- Pipetas Pasteur.
- Asa de platino.
- Medios de cultivo: agar sangre con 5% de sangre de carnero, agar chocolate. Caldos: tripticasa soya, tioglicolato sin indicador (opcional).

Toma de la muestra

Las muestras de LCR deben ser coleccionadas antes de la terapia antimicrobiana y por el médico tratante.

Punción lumbar

1. Limpiar el sitio de punción con solución antiséptica y alcohol antes de la inserción de la aguja.
2. Insertar una aguja biselada de calibre y tamaño adecuado en los interespacios vertebrales L3-L4, L4-L5 o L5-S1, hasta alcanzar el espacio subaracnoideo (Fig. 22).

- Colocar el LCR en tubos herméticos estériles. Se sugiere por lo menos la colección de la muestra en tres (3) tubos separados, para ser analizado en química, hematología y para el cultivo microbiológico (se prefiere el segundo tubo o el más turbio para el análisis microbiológico).
- El tubo que será enviado al laboratorio de microbiología debe contener preferiblemente un volumen mínimo de 5 ml. Sin embargo, existen circunstancias fisiológicas y clínicas en la cual la obtención de LCR es menor a 5 ml. No obstante, en cualquiera de los casos la muestra se distribuirá de manera que se asegure la investigación de bacterias de crecimiento rápido, estudio micológico y cultivo para micobacterias.

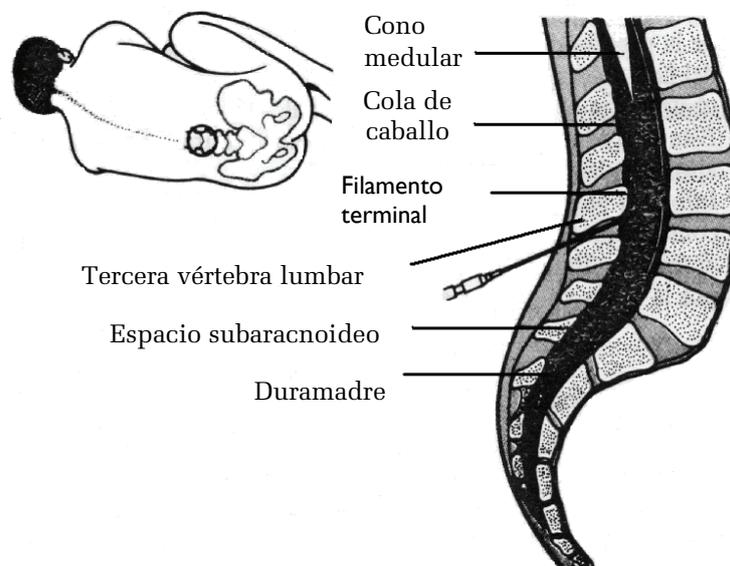


Figura 22. Posición correcta para la toma de muestra de LCR por punción lumbar

Primer período

Análisis macroscópico de la muestra, examen directo e inoculación en medios de cultivo (Fig. 23).

- Registre los datos personales del paciente y elabore una ficha de laboratorio con los datos epidemiológicos y clínicos del paciente, según anexo 1 (consulte la historia clínica del paciente o comuníquese con el médico tratante).
- Registre el volumen, apariencia y/o color del LCR.
- Recuerde que de acuerdo al volumen del LCR, usted decidirá si se debe centrifugar o no muestra (volumen mayor de 1 ml centrifugar a 3.000 rpm durante 10 minutos)

4. Con una gota de la muestra obtenida en el punto 3, prepare un frotis sin extender para ser teñido con la coloración de Gram.

Recomendación:

Deje secar la lámina al aire o sobre una superficie caliente (evitar el calor directo o secar con la llama del mechero). Se recomienda fijar la muestra con metanol porque previene la lisis de los eritrocitos y permite obtener un frotis más limpio. Deje secar el metanol y luego colorea con la tinción de Gram (deje secar al aire).

5. Dibuje y describa lo observado.
6. Los resultados del Gram deben comunicarse inmediatamente al médico tratante.
7. Elabore el reporte (Anexo 2).
8. Tome una o dos gotas del LCR con una pipeta Pasteur estéril e inocule los medios de cultivo sólidos (agar sangre y agar chocolate) y líquidos.
9. Si el laboratorio cuenta con pruebas para detección de antígeno, realice estas pruebas con una pequeña cantidad de la muestra de LCR, o utilice el sobrenadante del LCR obtenido en el punto 3.
10. Incube los medios de cultivo sólidos en atmósfera de microaerofilia (10% CO₂) y los líquidos en aerobiosis a 36 °C.
11. Revise los cultivos a las 24 horas.

Segundo período

1. Examine todos los medios de cultivo para evidenciar si hay o no desarrollo de microorganismos:

Si no se observa crecimiento sobre los medios sólidos éstos deben ser reincubados por 72 horas antes de ser descartados. Los caldos deben ser revisados diariamente por 5 a 7 días antes de ser descartados.

Si hay desarrollo de microorganismos sobre los medios de cultivo sólidos realice la coloración de Gram, de acuerdo a lo observado, proceda a montar las pruebas de identificación definitivas. Si el desarrollo de microorganismos se observa en los medios líquidos se realizará el Gram y se inoculará en medios sólidos en forma semicuantitativa. Simultáneamente se pueden montar las pruebas de identificación definitivas.

 - 1.1. Describa y dibuje lo observado al Gram.
 - 1.2. Todos estos hallazgos deben ser notificados inmediatamente al médico tratante. Elabore el reporte.
2. De acuerdo a lo observado en el o los frotis coloreados con Gram, y las reacciones observadas en los medios de cultivo sólidos, proceda a montar las pruebas bio-

químicas claves que le permitirán identificar definitivamente el microorganismo sospechoso. En esta misma etapa, monte el antibiograma (tenga en cuenta las recomendaciones señaladas en la práctica de pruebas de susceptibilidad). Incube las pruebas y el antibiograma por 24 horas en aerobiosis a 37 °C.

Señale las pruebas de identificación elegidas y los discos de antibióticos seleccionados para el antibiograma:

Pruebas bioquímicas de identificación	Discos de antibióticos seleccionados

Tercer período

Lectura de la pruebas de identificación y antibiograma.

1. Registre y analice los resultados observados en las pruebas de identificación. Procede a realizar la identificación definitiva del microorganismo.

Pruebas bioquímicas de identificación	Resultado

Identificación del microorganismo: _____

2. Realice la lectura del antibiograma y proceda a registrar los resultados en la siguiente tabla:

Disco de antibiótico	Diámetro en mm	Interpretación

Recomendación:

Si el microorganismo aislado es un *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis* es importante realizar la prueba de detección de β-lactamasas (prueba de la cefinasa). En el caso de que se aisle una enterobacteria o un microorganismo no fermentador de la glucosa, la detección de β-lactamasas se realizará con la prueba del doble disco (según las indicaciones del profesor).

3. Elabore el reporte definitivo (Anexo 2)

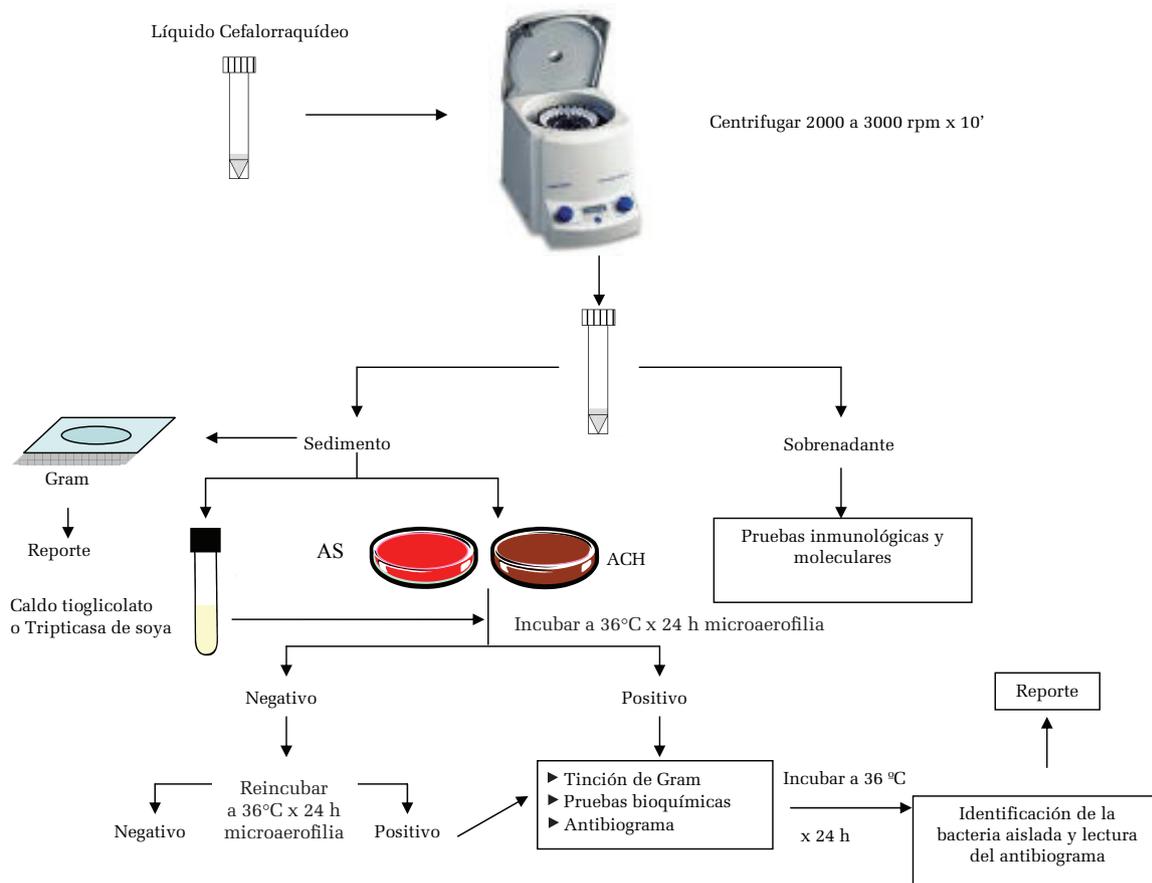


Figura 23. Estudio microbiológico del LCR

Autoevaluación

1. ¿Por qué se considera el estudio microbiológico del LCR una emergencia para el microbiólogo clínico?
2. Mencione algunas contraindicaciones para la toma de muestra de LCR por punción lumbar.
3. Mencione algunos casos en los cuales una muestra de LCR debe ser rechazada para estudio microbiológico.
4. ¿Por qué es importante conocer la citología del LCR cuando se realizan estudios microbiológicos de esta muestra?

Bibliografía

- (1) Cortés A. Infecciones del sistema nervioso central. En: Gómez A, Álvarez CA, León A. Enfermedades infecciosas en UCI. 1a ed. Bogotá: Distribuna Editorial Médica; 2004. p. 370-386.
- (2) Palmieri OJ. Meningitis infecciosa. En: Palmieri, OJ. Enfermedades infecciosas. 1era ed. Santiago de Chile: McGraw-Hill Interamericana; 2001. p. 128-45.
- (3) Ray, CG. Infecciones del sistema nervioso central. En: Ryan KJ, Ray CG. Sherris Microbiología médica. 4ta. ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004. p. 949-56.
- (4) Montiel F, Lam M. Procedimientos para realizar cultivos aerobios según la muestra. En: Montiel F, Lam M. Manual de microbiología clínica. Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo; 2001. p. 53-86.

práctica 11

Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto genital

Kiralba Sánchez

Objetivo general

Desarrollar la estrategia metodológica para el diagnóstico de infecciones del tracto genital.

Objetivos específicos

1. Distinguir los microorganismos de la microbiota habitual y los principales patógenos del tracto genital tanto femenino como masculino.
2. Clasificar los procesos infecciosos que afectan al tracto genital.
3. Describir las condiciones del paciente y las técnicas adecuadas para la obtención de muestras genitales.
4. Aplicar la metodología microbiológica convencional para el análisis de muestras vaginales, cervicales y uretrales.
5. Reconocer la importancia del examen directo como una herramienta útil para el diagnóstico diferencial de infecciones del tracto genital.

Aspectos teóricos

La mucosa genital es una región vulnerable a la infección producida tanto por microorganismos constitutivos de la microbiota habitual como por los adquiridos de forma exógena a través del contacto sexual. La primera porción de la uretra en el hombre, la vulva y la vagina en la mujer están normalmente colonizadas por diferentes microorganismos, que incluyen estafilococos coagulasa negativo, corinebacterias, estreptococos, micoplasmas, bacterias anaerobias y, con menos frecuencia, levaduras (Tabla 22).

En el caso de la mujer en edad reproductiva destaca la presencia de cantidades significativas de *Lactobacillus acidophilus*, este agente ejerce un control biológico

sobre otros microorganismos, constituyéndose en un mecanismo de defensa muy importante para el epitelio vaginal. En ocasiones las infecciones del tracto genital femenino pueden ser de origen endógeno, causadas principalmente por: *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* o *Candida* sp.(1)

Tanto en el hombre como en la mujer las infecciones genitales mas relevantes desde el punto de vista clínico, epidemiológico y de salud pública son las infecciones de transmisión sexual (ITS). Dentro de éstas tenemos las ITS clásicas: gonorrea, sífilis, chancro blando, linfogranuloma venéreo y granuloma inguinal. Las ITS de nueva generación comprenden las infecciones producidas por *Chlamydia trachomatis* (serovariedades D hasta la K), Virus Herpes Simplex, Virus Papiloma Humano y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana.(2)

Producto de las infecciones genitales se genera un variado espectro clínico con manifestaciones o sin ellas, que pueden derivar en complicaciones graves como la enfermedad inflamatoria pélvica, problemas ginecoobstétricos, esterilidad, cáncer e incluso la muerte.(3)

En los últimos años ha habido avances sustanciales en el diagnóstico de las infecciones de transmisión sexual, entre ellos, el uso de nuevas muestras para el análisis como orina o saliva y la aparición de nuevos métodos diagnósticos. Particularmente el diagnóstico de las ITS ha cambiado históricamente, debido a las dificultades que existen para la obtención de muestras representativas; por otra parte, los microorganismos como *C. trachomatis*, *Treponema pallidum* y los virus no se pueden detectar por metodologías convencionales. Así tenemos los métodos inmunológicos, aun cuando adolecen de baja sensibilidad, son utilizados ampliamente en el diagnóstico de algunos microorganismos fastidiosos, debido a su disponibilidad comercial y costo accesible. Actualmente se cuenta con métodos sofisticados y económicamente más costosos, de amplificación de ácidos nucleicos (AAN) como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) o la amplificación mediada por transcriptasa (TMA) que mejoran la sensibilidad (90-95%) y la especificidad (95%) al detectar hasta 10 organismos.(4)

Tabla 22. Microbiota habitual del tracto genital	
Región anatómica	Microorganismos
Uretra	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Mycoplasma</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Propionibacterium</i> sp., Enterobacterias, <i>Candida</i> sp.
Vagina	<i>Lactobacillus</i> sp., <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Corynebacterium</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Ureaplasma</i> sp., <i>Mycoplasma</i> sp., Enterobacterias, <i>Bacteroides</i> sp., <i>Peptostreptococcus</i> sp., <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Peptococcus</i> sp., <i>Candida</i> sp.

Tomado de: Koneman y col., 2001; Murray y col., 2002

Cuadros clínicos

En la mujer sexualmente activa las infecciones vaginales y cervicales son causa frecuente de consulta médica. Bajo la influencia de los estrógenos, el epitelio vaginal normal se cornifica, adquiriendo una resistencia relativa a la infección por algunos patógenos. No obstante, el ecosistema vaginal es dinámico y está sometido a cambios constantes, dados por factores endógenos y exógenos, entre los que se señalan: el estado hormonal, uso de contraceptivos orales, tratamientos genitales tópicos, embarazo, duchas vaginales, relaciones sexuales, uso de dispositivos intrauterinos (DIU), infecciones, stress, cambio de parejas sexuales, entre otros. (5,6) Los cuadros clínicos que con frecuencia se presentan en la mujer se especifican a continuación:

- **Vaginitis:** es la inflamación de la vagina que se acompaña comúnmente con secreción vaginal o leucorrea. Los síntomas no son específicos, lo que implica que el diagnóstico debería ser confirmado por pruebas de laboratorio y así evitar los tratamientos empíricos.

La etiología generalmente es infecciosa, aunque también puede estar originada por causas no infecciosas: iatrogénicas causada por agentes químicos, reacción a un cuerpo extraño o lavado muy frecuente; puede haber vaginitis alérgica a los componentes de espermicidas, semen, o productos de higiene sanitaria, ropa interior, entre otros. La vaginitis atrófica se presenta frecuentemente en la mujer postmenopáusica, siendo producto del adelgazamiento del epitelio vaginal y la falta de glucógeno, lo que conlleva a una reducción de la producción de ácido láctico y un incremento del pH vaginal. Estos cambios producen un sobrecrecimiento de bacterias coliformes no acidófilas; la leucorrea no es profusa.(7)

Las vaginitis infecciosas comúnmente padecidas por la mujer sexualmente activa son: la candidosis y la tricomoniasis. En algunos casos pueden ser ocasionadas por *G. vaginalis*, *Mycoplasma sp.*, *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*.(5,8)

Otras manifestaciones que pueden estar presente en los casos de vaginitis son: ardor, prurito, dolor durante las relaciones sexuales (coitalgia), sangramiento, entre otros.

- **Vaginosis bacteriana (VB):** es la causa más frecuente de infección vaginal entre las mujeres en edad fértil. Se caracteriza por la presencia de un flujo homogéneo, blanquecino o grisáceo, que puede estar presente en cantidad escasa, moderada o abundante; la secreción se adhiere fácilmente a la pared vaginal y puede expeler un olor fétido. El hallazgo más resaltante es el reemplazo de los lactobacilos por microbiota bacteriana, predominantemente anaeróbica, representada por *G. vaginalis* y especies de *Mobiluncus*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Mycoplasma*. Otro aspecto importante es la ausencia de inflamación. Es de destacar que aproximadamente el 50% de las mujeres que cursan con VB son asintomáticas. Los siguientes se consideran factores de riesgo: duchas vaginales, embarazo, uso de DIU, promiscuidad, nuevo compañero sexual, entre otros.(8)

- **Vaginosis citolítica:** esta entidad clínica está caracterizada por un sobrecrecimiento de los lactobacilos que normalmente están presentes en la vagina; esto lleva a la acumulación de grandes cantidades de ácido láctico, lo que hace que baje el pH y se produzcan signos y síntomas como: irritación e inflamación vulvar, prurito, disuria, dispareunia. Estas manifestaciones pueden orientar hacia una candidosis vaginal, de allí la importancia del laboratorio para el diagnóstico diferencial, el cual se puede llevar a cabo fácilmente con la observación microscópica de un extendido de la secreción vaginal.(9)

Las entidades clínicas anteriormente descritas, se presentan en mujeres en edad fértil, sin que necesariamente sean producto de un contacto sexual, a excepción de la tricomoniasis. Los cuadros que a continuación se refieren son producidos generalmente por microorganismos de transmisión sexual:

- **Cervicitis:** es un proceso generalmente asintomático pero con importantes complicaciones y secuelas a largo plazo. De hecho, es la vía de inicio más frecuente de las infecciones ginecológicas altas y de sus importantes implicaciones en la reproducción femenina. La cervicitis o endocervicitis se describe como la inflamación del epitelio endocervical y la existencia de una secreción mucopurulenta. Microscópicamente se define como la presencia de 10 o más polimorfonucleares por campo en los frotis endocervicales.(1)

En la actualidad, se reconocen cuatro agentes importantes productores de cervicitis: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, virus del herpes simple (VHS) y el virus del papiloma humano (VPH).

- **Uretritis:** consiste en la inflamación de la uretra, que ocasiona síntomas como: disuria, dispareunia, secreción uretral mucopurulenta y eritema del meato. La secreción uretral es más cuantiosa y purulenta en la uretritis gonocócica. A diferencia de la infección en la mujer, el 90 % de las uretritis en el hombre son sintomáticas. La uretritis no gonocócica (UNG) es el cuadro más común en el hombre y su principal agente etiológico es *C. trachomatis*. Desde el punto de vista microscópico se establece como criterio clínico de uretritis la presencia de 5 o más polimorfonucleares por campo, bajo objetivo de inmersión.(1)

Las ITS comprenden un grupo de infecciones transmisibles a través del contacto sexual, la etiología es muy amplia, algunos autores refieren la existencia de más de 20 agentes infecciosos productores de ITS, entre bacterias, virus, hongos y parásitos (Tabla 23). (10) Clínicamente, los signos y síntomas son muy variables y han servido de base en la clasificación sindrómica de las ITS, para el manejo, diagnóstico y tratamiento de estas infecciones (Tabla 24). (11)

Tabla 23. Agentes productores de infecciones de transmisión sexual

BACTERIAS	VIRUS	HONGOS	PARÁSITOS
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Inmunodeficiencia humana	<i>Candida albicans</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Herpes simple tipo II	<i>Trichophyton</i> sp	<i>Phthirus pubis</i>
<i>Treponema pallidum</i>	Papiloma humano	<i>Microsporium</i> sp	<i>Sarcoptes scabiei</i>
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Molusco contagioso		<i>Giardia lamblia</i>
<i>Klebsiella granulomatis</i>	Citomegalovirus		<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Hepatitis B		
<i>Mycoplasmas</i> sp.	Hepatitis A		
<i>Ureaplasma</i> sp.			

Tomado de: Drew, 2004

TABLA 24. Clasificación sindrómica de las infecciones de transmisión sexual

Síndrome	Enfermedad	
ITS supurativas	Gonorrea no complicada	Uretritis, cervicitis, proctitis
	Gonorrea complicada	Síndrome de artritis-dermatitis, perihepatitis, endocarditis
	Uretritis no gonocócica	Uretritis, endocervicitis
	Vaginitis	Tricomoniasis Candidiasis
Ulceras genitales	Sífilis 1ª Herpes genital	
	Granulomas	Chancro blando Granuloma inguinal Linfogranuloma venéreo
Verrugas genitales	Condiloma o papiloma Molusco contagioso	
Ectoparasitosis	Pediculosis púbica Escabiosis	
ITS Sistémicas	Infección por VIH Hepatitis B Sífilis 2ª	

Tomado de: Morbidity and Mortality Weekly Report, 2002; Mandell y col., 2002

Diagnóstico

El éxito del diagnóstico de las infecciones genitales, depende primordialmente de que la muestra a procesar sea representativa del proceso infeccioso, que la misma sea recolectada en condiciones óptimas y transportada adecuada y rápidamente al laboratorio. Así mismo, es necesario el conocimiento de la microbiota habitual, los patógenos potenciales y de los diferentes factores que conforman el ecosistema genital. Todos estos aspectos repercuten en la validez del diagnóstico microbiológico.(6)

El diagnóstico de la mayoría de las infecciones genitales, y particularmente de las ITS, se fundamenta en el cuadro clínico, ya que los análisis de laboratorio no están disponibles o son demasiado costosos. Es por ello que desde 1990, la organización mundial de la salud (OMS), recomienda el manejo de las ITS con base en el diagnóstico sintromico, que recae sobre el médico.(12)

No obstante, el método tradicional por análisis de laboratorio, se sigue fomentando en la resolución de casos que no se resuelven con el tratamiento empírico y en las pacientes que acuden a las consultas de ginecología y obstetricia para el manejo adecuado y no exponerlas a tratamientos excesivos.

Etapa pre-analítica

La valoración de un paciente con síntomas genitales requiere de una exploración física y una anamnesis detallada. Además de los datos filiatorios y clínicos, es preciso obtener otros datos que pueden orientar el diagnóstico microbiológico, entre los que se citan:

- En el caso de la mujer: uso de productos de higiene femenina, técnica anticonceptiva, uso de antibióticos que pueden alterar el ecosistema vaginal, antecedentes familiares de diabetes, ciclo menstrual, uso de duchas vaginales, entre otros.
- En caso de hombre y mujer: investigar sobre el número de parejas sexuales, fecha de contacto sospechoso, nuevo compañero sexual, inicio de los síntomas, antecedentes de ITS, estilo de vida, hábitos sexuales (relaciones genito-oral, genito-anal), uso de antibióticos, sintomatología genital (dolor, prurito, dispareunia, ardor, disuria).

Etapa analítica

En la Tabla 25 se señalan las muestras requeridas según el cuadro clínico o síndrome y los microorganismos a investigar.

Tabla 25. Muestras a procesar según el síndrome infeccioso y el patógeno a investigar

Cuadro clínico	Muestra clínica	Patógeno
Uretritis	Hisopado uretral Orina de primer chorro	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>C. trachomatis</i> Virus del Herpes simple
Cervicitis	Hisopado de endocérvix	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>C. trachomatis</i> Virus del Herpes simple Virus Papiloma Humano
Vulvo-vaginitis	Hisopado de fondo de saco Hisopado de introito vaginal (niñas o prepúberes)	<i>C. albicans</i> <i>Trichomonas vaginalis</i> Enterobacterias <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Gardnerella vaginalis</i>
Úlceras	Exudado o raspado de la úlcera	<i>T. pallidum</i> <i>H. ducreyi</i> Virus del Herpes simple
Sífilis	Suero	<i>T. pallidum</i>

Tomado de: Koneman y col., 2001; Black, 2000.

Obtención de muestras del tracto genital femenino

Condiciones previas: La paciente no debe estar recibiendo tratamiento antimicrobiano. No practicarse duchas vaginales, ni tener relaciones sexuales 24 horas antes de la obtención de la muestra. Así mismo, no debe bañarse el día de la recolección de la misma.

Materiales

- Espéculo estéril
- Hisopos de alginato de calcio o de algodón previamente buferados y esterilizados
- Solución salina fisiológica estéril
- Medio de transporte: Amies o Stuart
- Láminas portaobjetos limpias y desengrasadas.

Procedimiento: Para la obtención de la muestra vaginal y/o cervical, se debe emplear un espéculo; la maniobra puede ser realizada por el médico en la consulta o por el microbiólogo en el laboratorio, siempre que se disponga de una camilla ginecológica. Por lo general, las muestras son enviadas al laboratorio, por ello es importante la instrucción del personal que recolectará las mismas.(13)

Observación: si la muestra es recolectada en el laboratorio de microbiología, se debe disponer además de los medios de cultivo necesarios, según el tipo de muestra a obtener.

Procedimiento para la investigación microbiológica de muestras vaginales

1. Características macroscópicas de la muestra: Valorar e identificar las siguientes características en la secreción genital:

- Cantidad
- Olor
- Color
- Consistencia
- pH

2. Características microscópicas de la muestra: Con la muestra vaginal obtenida se debe realizar un montaje en fresco entre lámina y laminilla y dos extendidos finos para teñir al Gram.

- **Examen al fresco:** informar la presencia de células descamativas, leucocitos y bacterias, presencia o ausencia de levaduras y de trofozoos de *Trichomonas vaginalis*.
- **Gram:** Herramienta citológica muy útil para el diagnóstico diferencial entre vaginitis y vaginosis bacteriana o citolítica.
 - Evaluar y semicuantificar los morfotipos bacterianos predominantes, cotejar los resultados con la tabla conocida como sistema de gradación de Nugent (Tabla 26).
 - Identificar las células guía o clave, es decir, células descamativas recubiertas por cocobacilos gramvariables.
 - Valorar la microbiota habitual presente: la observación de > 30 bacilos grampositivos largos y delgados (*Lactobacillus* sp.) por campo de inmersión y escasa microbiota bacteriana mixta, se considera un “frotis normal”.
 - Valorar y reportar la presencia de leucocitos polimorfonucleares, levaduras y signos de citólisis (destrucción de células con presencia de núcleos desnudos).(14)

Tabla 26. Sistema de gradación de Nugent

Puntaje	Cantidades de morfotipos observados con mayor aumento de:		
	Lactobacilos	<i>Gardnerella</i> <i>Prevotella/Porphyromonas</i>	Bacilos gramvariables curvos
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ó 2+
2	2+	2+	3+ ó 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

Cuantificación: 0: ningún organismo; 1+: < 1 morfotipo; 2+: 1 a 5 morfotipos; 3+: 6 a 30 morfotipos; 4+: > 30 morfotipos.

Interpretación: Puntaje total: 0-3: Negativo para VB; 4-6: flora vaginal alterada; 7-10: Vaginosis bacteriana.

Tomado de: Nugent y col., 1991

3. Cultivo de secreción vaginal: En la figura 24 se presenta el protocolo para la investigación microbiológica de una secreción vaginal. Es de destacar que el cultivo es requerido en casos particulares: en mujeres embarazadas y en mujeres con leucorreas inespecíficas o resistentes al tratamiento. En VB no se recomienda el cultivo de *G. vaginalis* por cuanto forma parte del ecosistema vaginal normal, no obstante, se dispone de una serie de criterios clínicos y microscópicos bien establecidos que orientan al diagnóstico hacia una VB (Tabla 27 y 28).(15,16) Se recomienda la siembra de la secreción en un agar bilis semisólido para la recuperación de *Candida* sp.

Tabla 27. Criterios clínicos de Amsel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana

- Presencia de una secreción homogénea, fina y adherente
- pH > 4.5
- Presencia de al menos 20% de células claves del total de células epiteliales.
- Prueba de aminas volátiles positiva al agregar hidróxido de potasio (10%) a la secreción

La presencia de al menos 3 de estos criterios evidencia el diagnóstico clínico de vaginosis bacteriana

Tomado de: Navarrete y col., 2000.

Tabla 28. Diagnóstico diferencial entre vaginitis y vaginosis

Variable	Candidiasis	Tricomoniasis	Vaginosis bacteriana	Vaginosis citolítica
Características del flujo	Moderado a abundante, blanco, como leche cortada, olor ácido	Moderado a abundante, purulento, espumoso, olor fétido	Escaso, moderado o abundante, adherente, homogéneo, blanco a grisáceo, olor a pescado	Moderado a abundante, blanco homogéneo, olor ácido o inodoro
pH del flujo	4-4.5	5-6	> 4.5	3.5-4.5
Test de aminas	Negativo	Variable	Positivo (70-80%)	Negativo
PMN	Escasos	Moderado a abundante	< 1xcampo	Escasos
Lactobacilos	Presentes (< 30xc)	Escasos (< 10xc)	Ausentes o disminuidos	Abundantes (> 30xc)
Presencia de blastoconidias y pseudohifas	Positivo (70%)	Negativo	Negativo	Negativo
Trofozoitos de <i>T. vaginalis</i>	Negativo	Positivo (60%)	Negativo	Negativo
Presencia de células guía o clave	Negativo	Negativo	Positivo (90%)	Negativo
Citólisis	Leve	Ausente	Ausente	Intensa

PMN: polimorfonucleares

Tomado de: Sobel, 1997; Navarrete y col., 2000

4. Análisis de los cultivos: Revisar los cultivos entre las 24, 48 o 72 horas de incubación. Correlacionar la cantidad y variedad de morfotipos coloniales con los resultados observados en el Gram. La valoración de la cantidad de crecimiento, sigue los criterios de interpretación que hasta ahora se han manejado con otras secreciones, es decir, por cuadrantes. Así tenemos que si el desarrollo se observa en primer y segundo cuadrante, se estima crecimiento escaso; la observación de colonias hasta el tercer y cuarto cuadrante se considera un crecimiento moderado o abundante respectivamente.(13)

El desarrollo moderado o abundante de microorganismos indígenas debe ser considerado y repetirse la obtención de la muestra. En caso de persistir el mismo patrón, se le dará importancia siempre que: se descarte la presencia de patógenos, persistan los signos y síntomas de infección y al examen microscópico el posible patógeno se observe en forma predominante sobre las otras bacterias, disminución de los lactobacilos y asociado a células inflamatorias.(5,7,14)

A partir del medio agar-bilis se realiza una preparación húmeda para la búsqueda de estructuras levaduriformes, primordialmente clamidoconidias que nos darían el diagnóstico de *Candida albicans*.

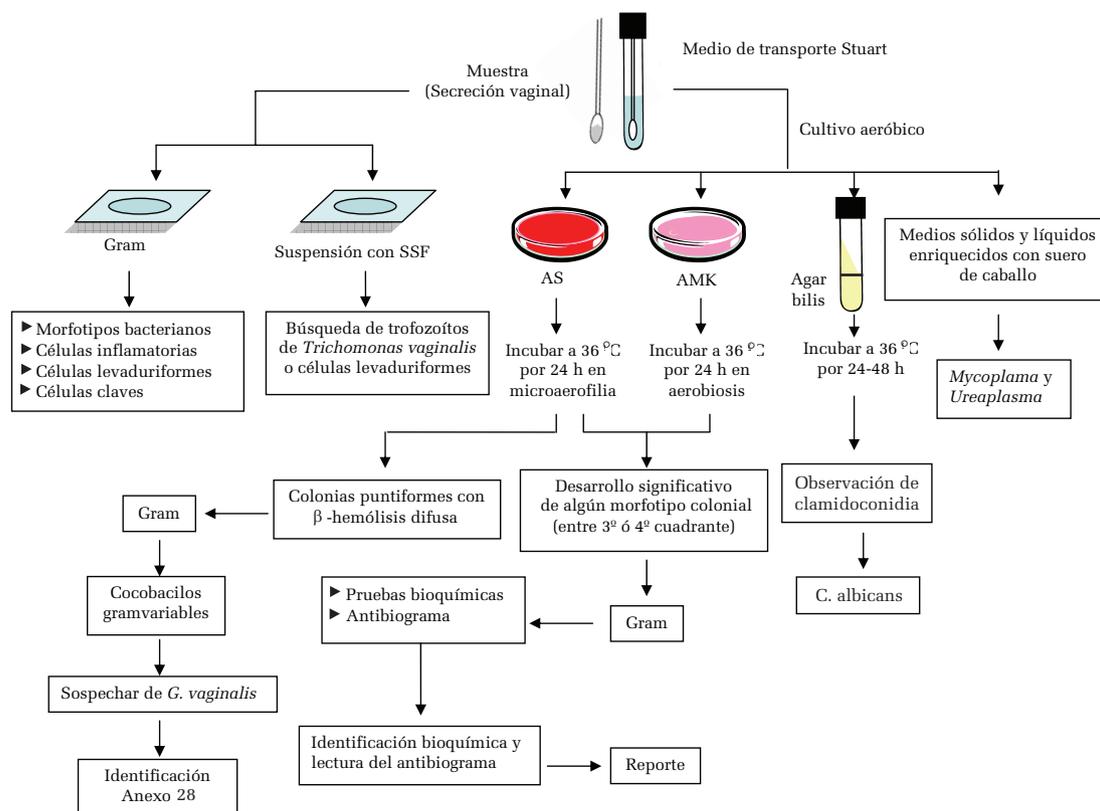


Figura 24. Estudio microbiológico de secreción vaginal

Obtención de secreción uretral

Esta muestra puede ser obtenida en el laboratorio de microbiología previo entrenamiento del personal.

Condiciones previas del paciente: No debe estar recibiendo tratamiento antimicrobiano, abstinencia sexual de 24 horas, el paciente no se bañará el día de la recolección de la muestra y debe tener una retención urinaria de al menos 4 horas.

Materiales

- Hisopos masculinos, buferados y estériles
- Solución salina fisiológica
- Láminas portaobjeto, limpias, desengrasadas
- Medio de transporte: Amies o Stuart
- Medios de cultivo: agar sangre (AS), agar Thayer-Martin (ATM) y agar Mac Conkey (AMK)

Procedimiento

Se recomienda obtener la muestra en la mañana. Previa retracción del prepucio, inspeccionar la presencia de la gota matinal, en su defecto, practicar la asepsia del meato urinario con un hisopo y solución salina fisiológica estéril. Indicar al paciente previo lavado de manos que presione el glande para estimular la salida de la secreción. Introducir y rotar el hisopo dentro de la uretra aproximadamente 2 centímetros y obtener la muestra.

Otro espécimen recomendado con este propósito es la orina de primer chorro, para lo cual se solicita al paciente que evacue los primeros 10 mL de orina en un recolector estéril.

Procesamiento de secreción uretral y cervical

Estas muestras generalmente son remitidas al laboratorio para la investigación de patógenos sexualmente transmisibles. En la figura 25 se esquematiza el protocolo convencional de uretritis y cervicitis.

Examen directo

Fresco: para detectar los trofozoitos de *T. vaginalis*.

Gram: investigar la presencia de diplococos gramnegativos intracelulares o extracelulares y la presencia de células inflamatorias.

Giemsa: observar la presencia de cuerpos de inclusión sugestivos de *C. trachomatis*.

Tinción con anticuerpos fluorescentes: para la investigación de *C. trachomatis*.

Inoculación de los medios de cultivo: A partir de la muestra directa o del Stuart, proceder a la siembra de la secreción en AS, ATM y AMK. En el caso de la orina de primer chorro se centrifuga y se siembra el sedimento.

Análisis de los cultivos: Revisar los medios inoculados entre 48-72 horas de incubación. En ATM, evalúe la presencia de colonias sospechosas de *N. gonorrhoeae* y proceda a su identificación (Anexo 12). Los medios AS y AMK permitirán investigar otros grupos bacterianos grampositivos y gramnegativos que estén asociados al gonococo o como agentes etiológicos de uretritis o cervicitis.

El desarrollo moderado o abundante de microorganismos potencialmente patógenos, debe ser considerado de importancia clínica siempre que: se descarte la presencia de patógenos, hallazgos de signos y síntomas de infección, asociados a una respuesta inflamatoria.(6)

Investigación de otros microorganismos patógenos o potencialmente patógenos

- ***Chlamydia trachomatis*** es la principal causa de infecciones genitales tanto en hombres como en mujeres jóvenes. Los métodos citológicos para la investigación de *Chlamydia* tienen una baja sensibilidad (45-62%), las técnicas inmunológicas (EIA e IFD) pueden alcanzar hasta una sensibilidad de 75%. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos (PCR, LCR y TMA) hoy por hoy se han convertido en el patrón de oro para el diagnóstico de la infección clamidial.(2)
- ***Ureaplasma sp.* y *Mycoplasma genitalium***: son los agentes infecciosos más importantes (después de *Chlamydia*) productores de uretritis no gonocócica. El cultivo de estos microorganismos es complicado por ser microorganismos muy exigentes, sin embargo *Ureaplasma sp.* se puede recuperar a partir de medios de cultivo enriquecidos con suero de caballo. En el comercio existen equipos que detectan la presencia de este microorganismo y que permiten a su vez conocer los patrones de sensibilidad antimicrobiana. La detección de *M. genitalium* es más complicado por ser un microorganismo anaerobio muy exigente, por lo que se han diseñado métodos moleculares para su diagnóstico a través de RCP.(2)

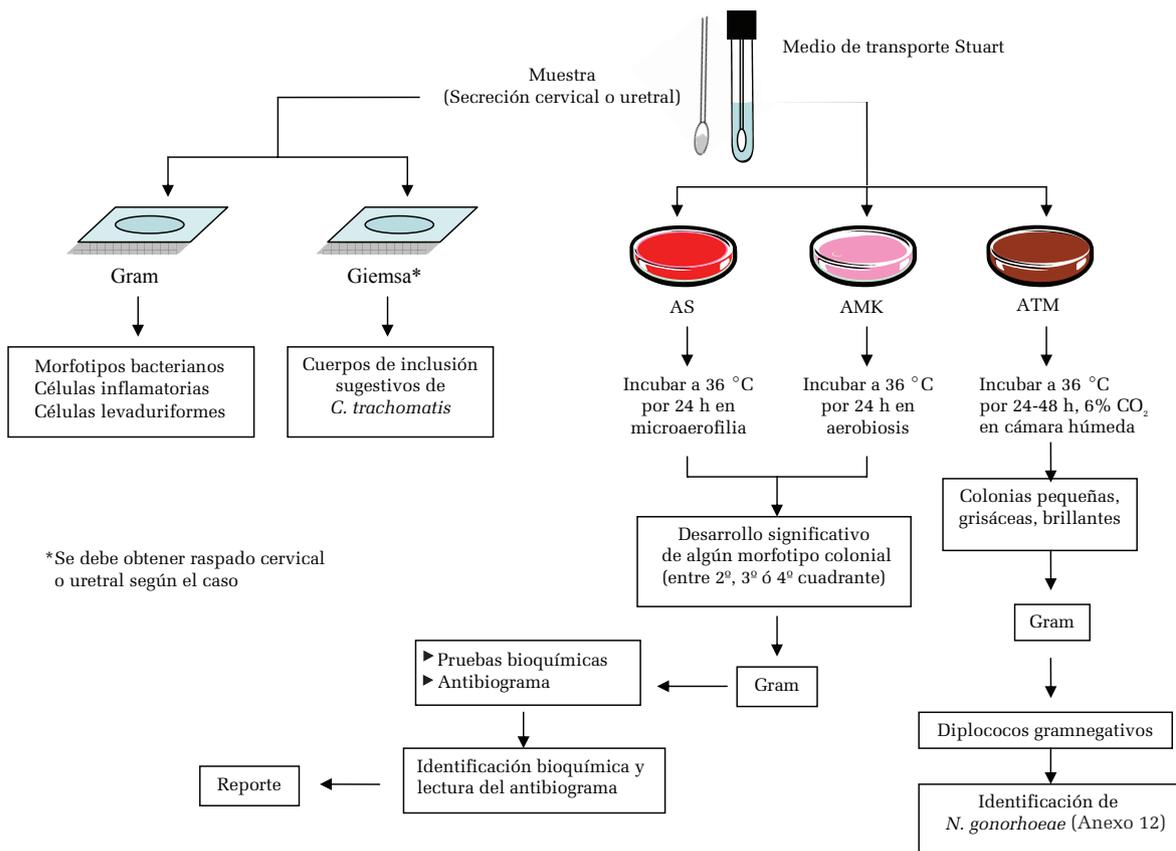


Figura 25. Estudio microbiológico de secreción cervical o uretral

Etapa post-analítica

Para el reporte de los resultados se debe seguir el formato del Anexo 2. Es importante resaltar que a diferencia de otros informes, los de las muestras genitales, en ocasiones debe ir acompañado con algunas interpretaciones relevantes.

- Informe del examen directo: del fresco, Gram y Giemsa (en los casos que aplique). Detallando semicuantitativamente los diferentes morfotipos microbianos y la presencia de células (epiteliales e inflamatorias). Del examen al fresco se puede reportar directamente la presencia de tricomonas: “Se observaron trofozoitos de *Trichomonas vaginalis*”
- A partir de una muestra de secreción vaginal, siguiendo los criterios de Nugent, informar: “Negativo para vaginosis bacteriana”, o “Microbiota bacteriana alterada” o “Vaginosis Bacteriana”
- En los cuadros de uretritis aguda con secreción purulenta o mucopurulenta donde se observe la morfología típica de neiseria, es decir diplococos gramnegativos, reportar su presencia intra o extracelular. En estos casos, el Gram constituye un diagnóstico presuntivo de *N. gonorrhoeae* y se debe emitir el resultado del Gram sin esperar el cultivo.
- La observación de cuerpos de inclusión dentro del citoplasma de las células del epitelio escamo-columnar, a través de la coloración de Giemsa se reportará: “Se observaron cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos sugestivos de *Chlamydia trachomatis*”.
- Reporte el microorganismo aislado de manera semicuantitativa si se trata de microorganismos potencialmente patógenos.
- En el caso de cultivos positivos para gonococo, se reporta “Desarrollo de *Neisseria gonorrhoeae*”.
- En el caso de cultivos negativos o desarrollo de microorganismos habituales, reportar: “No hubo crecimiento microbiano en 72 h de incubación” o “Desarrollo de microbiota habitual de la región”, respectivamente.

11 Actividad práctica

Primer período: Procesamiento de muestras vaginales, cervicales y uretrales

Materiales

- Muestra en medio de transporte y en solución salina fisiológica.
- Hisopos estériles
- Asa de platino
- Láminas porta objeto
- Laminillas cubre objeto
- Medios de cultivo: AS, ATM, AMK y agar bilis
- Extendidos de secreción vaginal, cervical y uretral.
- Coloración de Gram
- Coloración de Giemsa

Procedimiento

1. Elaborar la ficha clínico-epidemiológica del paciente
2. Realizar el examen al fresco lo más pronto posible, entre lámina y laminilla y observarlo con objetivo de 10X y 40X
3. Proceder a la siembra de las muestras cervical y uretral por la técnica de agotamiento en AS, ATM y AMK
4. Incubar AS y ATM en microaerofilia, a 36 °C hasta por 72 horas, con revisión periódica cada 24 h. AMK en aerobiosis por 24-48 h.
5. La secreción vaginal se sembrará en AS, AMK y en agar bilis. Incubar AS en microaerofilia, los demás en aerobiosis por 24 a 48 h.
6. Fije las láminas suministradas con calor para proceder a teñirlas con la técnica de Gram.
7. Los extendidos de secreción vaginal teñidos al Gram, se analizarán e informarán siguiendo los criterios de Nugent.(15)
8. Uno de los frotis de secreción cervical y uretral se fijará con metanol absoluto para proceder a realizar la técnica de Giemsa (ver Práctica N° 6). Observe al microscopio con objetivos de 10X y 40X.
9. Registre los resultados de la observación de los exámenes directos.

Segundo período: Revisión de los cultivos

Materiales

- Asa de platino
- Láminas porta objeto
- Laminillas cubre objeto
- Coloración de Gram
- Batería bioquímica para *Neisseria*
- Batería bioquímica para *Gardnerella*

Procedimiento

1. Revisión de los cultivos sembrados en el primer período, evaluar semicuantitativamente el desarrollo bacteriano. Realizar Gram a cada colonia diferente que desarrolle en cada uno de los medios de cultivo (esto con el fin de reconocer la microbiota habitual).
2. Las colonias de valor diagnóstico se analizarán siguiendo los esquemas de identificación propuestos, dependiendo de la morfología y reacción al Gram. Para la identificación de *G. vaginalis* ver anexo 28.
3. Inocular las pruebas bioquímicas suministradas a partir de purezas de las cepas de interés clínico.
4. Realizar una preparación húmeda a partir del agar bilis entre lámina y laminilla, para investigar la presencia de blastoconidias, hifas y clamidoconidias.
5. Registre los resultados de los exámenes microscópicos.

Tercer período: Identificación bacteriana

1. Identificar el o los microorganismos de interés clínico, cotejando los resultados con las tablas de identificación que se han manejado en el manual y en esta práctica en particular.
2. Registre los resultados y elabore el reporte (Anexo 2).

Autoevaluación

1. Explique la utilidad del Gram en el diagnóstico microbiológico de infecciones del tracto genital
2. ¿Cuál es la importancia de la microbiota habitual en el tracto genital femenino?
3. Enumere los patógenos clásicos del tracto genital
4. Elabore un cuadro donde señale para cada ITS los microorganismos etiológicos y el método de diagnóstico a emplear
5. En las secreciones genitales, hacia qué diagnóstico clínico orienta la presencia de:
 - a) células guía: _____
 - b) citólisis: _____
 - c) diplococos gramnegativos intracelulares: _____
 - d) pH mayor de 4.5: _____
 - e) polimorfonucleares mayor de 10 x c de inmersión: _____
6. Mencione los factores de riesgo para adquirir una ITS y para el desarrollo de una VB.
7. Señale las diferencias entre vulvovaginitis y vaginosis bacteriana.
8. Según la utilidad en el laboratorio cómo se clasifica el medio ATM y explique las ventajas para su uso.

Bibliografía

- (1) Mandell G, Benett J, Dolin R. Enfermedades infecciosas. Principios y Práctica. 5ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 2002.
- (2) Vázquez F, Otero L, Ordás J, Junquera M, Varela J. Actualización en infecciones de transmisión sexual: epidemiología, diagnóstico y tratamiento. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:392-411.
- (3) Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Microbiología médica. Texto atlas color. 4ª ed. España: Mosby Elsevier Science; 2002.
- (4) Black C, Morse S. The use of molecular techniques for the diagnosis and epidemiologic study of sexually transmitted infections. *Curr Infect Dis Reports* 2000; 2:31-43.
- (5) Flores R, Martínez R, Llaca J. Prevalencia de vaginosis bacteriana en una clínica universitaria. *Revista de Salud Pública y Nutrición* 2003; 4:24-27.
- (6) Isemberg H, (Ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington (DC):American Society for Microbiology; 1992.
- (7) Vilar E. Vaginitis. (en línea) 2001 (citado 2 Marzo 2004) Disponible en: URL: <http://www.doyma.es>
- (8) Caballero R, Batista R, Cué M, Ortega L, Rodríguez M. Vaginosis bacteriana. *Resumed* 2000; 13:63-75.
- (9) Cibley L. Cytolytic vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1245-1249.
- (10) Drew L. Infecciones de transmisión sexual. En: Ryan KJ, Ray CG. *Sherris Microbiología médica*. 4ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004. p. 977-982.
- (11) Centers for Disease Control and Prevention. Screening test to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. Atlanta, Canadá: MMWR; 2002, 51:1-40
- (12) ONUSIDA. Enfoques de salud pública para el control de las ETS: Actualización técnica del ONUSIDA. (en línea) 1998 (citado 17 abril 2005) Disponible en: URL: <http://www.unaids.org>
- (13) Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas a color. 5ª ed. España: Médica Panamericana; 2001.
- (14) Navarrete P, Domínguez M, Castro I, Zemelman R. Evaluación de los criterios de Nugent y Amsel para el diagnóstico de vaginosis bacteriana. *Rev Med Chile* 2000; 128: 767-771.
- (15) Nugent R, Krohm M, Hillier S. Reality of diagnosing by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29:292-301.
- (16) Sobel J. Vaginitis. *New Engl J Med* 1997; 337:1896-1903.

práctica 12

Diagnóstico microbiológico de las infecciones por bacterias anaerobias

Beatriz Nieves

Objetivo general

Describir el procedimiento convencional para aislar e identificar bacterias anaerobias a partir de muestras clínicas.

Objetivos específicos

1. Describir las características clínicas que sugieren una infección anaeróbica
2. Describir los hallazgos bacteriológicos que sugieren una infección por bacterias anaerobias.
3. Nombrar las infecciones anaeróbicas más frecuentes y sus posibles agentes etiológicos
4. Explicar el procedimiento a seguir para la colección, transporte y cultivo adecuado de la muestra para el diagnóstico de una infección anaeróbica y establecer las diferencias con el procedimiento a seguir para la investigación de bacterias aerobias.
5. Señalar los métodos utilizados para la identificación de bacterias anaerobias.

Aspectos teóricos

Las bacterias anaerobias son patógenos importantes en una amplia variedad de infecciones en el hombre. Ellas pueden estar involucradas en esencialmente cualquier tipo de infección bacteriana en humanos, desempeñando un papel importante en la mayoría de las categorías de infecciones de piel y tejidos blandos, osteomielitis, infecciones pleuropulmonares, intra-abdominales y del tracto genital femenino (Tabla 29) (1,2,3,7,8). Del amplio número de bacterias anaerobias que forman parte de la flora normal, solo unos pocos géneros están involucrados como agentes etiológicos de infecciones en humanos. (4)

Los anaerobios varían en sus requerimientos nutricionales y en su sensibilidad al oxígeno, por lo que una apropiada colección, cultivo e incubación es vital para su recuperación.

Principios generales

Selección y colección de los especímenes clínicos

Las muestras naturalmente contaminadas no son adecuadas para la búsqueda de bacterias anaerobias, salvo ciertos especímenes, como por ejemplo, heces para la búsqueda de *Clostridium difficile* en caso de sospecha de colitis pseudomembranosa o diarrea asociada al consumo de antibióticos. (9)

TABLA 29. Aislamiento de bacterias anaerobias en pacientes

INFECCIÓN	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Prevotella</i> Pigmentadas, <i>Porphyromonas</i> sp., <i>Prevotella oralis</i>	<i>Prevotella bivia</i> , <i>Prevotella disiens</i>	<i>Fusobacterium</i> sp.
Sangre	1	1	2	1	0	1
LCR	2	1	1	2	0	1
Cabeza y cuello	3.	1	1	3	0	3
Torácica	2	1	1	3	0	3
Abdominal	3	3	3	1	1	1
Gineco-obstétrica	3	2	1	1	2	1
Piel y tejidos blandos	2	1	2	2	1	1

0: Ninguno

1: Raro (1% - 33%)

2: Común (34% - 66%)

3: Muy común (67% - 100%)

Las muestras provenientes de sitios normalmente estériles obtenidas por punción, previa asepsia de la piel, son las más convenientes. (9)

En caso de infecciones de las vías urinarias, la orina debe obtenerse por punción suprapúbica, en caso de infecciones del tracto respiratorio inferior, la aspiración transtraqueal o punción pulmonar es la forma más adecuada para obtener la muestra (Tabla 30) (1, 5, 10).

TABLA 30. Colección de especímenes	
Apropiadas	No apropiadas
<ul style="list-style-type: none"> • Biopsia de tejidos obtenidos quirúrgicamente. • Aspirado pulmonar • Líquido articular • Líquido peritoneal • Contenido de abscesos • Orina colectada por aspiración suprapúbica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hisopado nasal, nasofaríngeo • Esputo expectorado • Lavado broncoalveolar • Contenido gástrico • Heces, excepto para búsqueda de <i>C. difficile</i>, <i>C. perfringens</i> • Orina emitida por micción o cateterizada • Hisopado vaginal, uretral cervical. • Cualquier material adyacente a una membrana mucosa que no haya sido apropiadamente descontaminada.

Transporte

Un medio de transporte óptimo debe contrarrestar los efectos ambientales letales para las bacterias anaerobias, tales como, oxígeno molecular, temperaturas bajas, pH elevado, sobrecrecimiento de bacterias aerobias o facultativas.

Cuando la muestra se va a procesar de inmediato, luego de su colección, se puede transportar en la misma jeringa, expulsando previamente el aire contenido en ella.

En el mercado existen envases especiales que contienen una mezcla de gases libres de oxígeno. En caso de muestras coleccionadas con hisopos, el medio de transporte pre-reducido soporta la viabilidad de los anaerobios por unas pocas horas (9).

Cultivo

Para el cultivo de muestras donde se sospeche la participación de flora bacteriana mixta, tanto anaerobia como facultativa, se recomienda el uso de medios de cultivo no selectivos y selectivos. Como agar base se emplea agar Schaedler, agar Brucella, agar Wilkins Chalgren, agar CDC. (8, 9)

Dichos medios pueden hacerse selectivos con la incorporación de ciertas sustancias como kanamicina, gentamicina, feniletilalcohol, vancomicina, ácido nalidíxico, entre otras. (9)

Las fórmulas comerciales de algunas de estas bases contienen vitamina K y hemina, cofactores necesarios para el crecimiento de algunos anaerobios gramnegativos de los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas*. (7, 8)

Cabe destacar que existen también bases comerciales especiales para el aislamiento de ciertos anaerobios como *C. perfringens*, *C. difficile* y especies del grupo *Bacteroides fragilis*.

Los medios se deben incubar bajo condiciones anaeróbicas utilizando sobres generadores de CO₂ e H₂, durante 5-7 días a 36 °C.

Ciertos anaerobios como *C. difficile* y *C. perfringens* son de crecimiento rápido, por lo que los medios especiales para estos gérmenes se pueden inspeccionar a las 24–48 horas (Tabla 31). (8, 9)

TABLA 31. Medios de cultivos selectivos	
Medio	Uso
<ul style="list-style-type: none"> • Agar bilis esculina • Agar sangre* feniletil alcohol • Agar sangre* Kanamicina vancomicina • Cicloserina cefoxitin yema de huevo. • Agar sulfito polimixina sulfadiazina yema de huevo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Aislamiento grupo <i>B. fragilis</i>. • Aislamiento de anaerobios Gram positivos y negativos. • Aislamiento de anaerobios Gram negativos • Aislamiento de <i>C. difficile</i>. • Aislamiento de <i>C. perfringens</i>

* Con cualquiera de las bases mencionadas anteriormente: Agar Schaedler, Agar CDC, Agar Wilkin Shaedler, Agar Brucella.

Aislamiento primario e identificación (9)

- Características macro y microscópicas de las colonias. En la Tabla 32 se muestran algunas características útiles en la identificación de algunas bacterias anaerobias.
- Subcultivos en caldo carne picada u otro caldo especial que soporte el crecimiento, como caldo tioglicolato, caldo Schaedler, caldo Wilkins Chalgren.
- Control anaeróbico del crecimiento en caldo y coloración de Gram del extendido para verificar pureza.
- Identificación bioquímica

TABLA 32. Identificación preliminar en cultivos primarios

Características	Identificación posible
Corroe el agar.	Grupo <i>Bacteroides urealyticus</i>
Pigmentación negra.	<i>Porphyromonas, Prevotella</i>
Fluorescencia roja brillante.	<i>Prevotella intermedia, P. loeschii</i>
Fluorescencia azul.	<i>Fusobacterium</i> sp.
Doble zona de hemólisis	<i>Clostridium perfringens</i>
“Huevo Frito”	<i>Fusobacterium varium.</i>
“Enverdece el agar”	<i>Fusobacterium</i> spp.
Grandes con bordes irregulares	<i>Clostridium</i> spp.
“Cabeza de medusa”	<i>Clostridium septicum</i>
“ Diente molar”	<i>Actinomyces</i> spp.
“Migas de pan”	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Crecimiento extendido (Swarming)	<i>Clostridium</i>

Método convencional: Galería de medios diferenciales que ponen en evidencia la capacidad de microorganismos para utilizar carbohidratos, licuar la gelatina, producir indol y ureasa, reducir los nitratos, hidrolizar la esculina, crecer en bilis al 20 %, producir lecitinasa o lipasa, entre otras, son las más utilizadas. En las tablas 34 y 35 se muestran las pruebas diferenciales para el nivel I y II de identificación de bacterias anaerobias Gram negativas y Gram positivas, respectivamente.

Métodos bioquímicos rápidos miniaturizados: API 20: utiliza 20 sustratos: 15 carbohidratos, úrea, gelatina, esculina, medio para detectar indol.

Requiere incubación anaeróbica durante 48 horas.

Métodos enzimáticos: RAPID ID32 detecta enzimas preformadas en unas pocas horas después de la inoculación, se incuba aeróbicamente. Al igual que el API, este sistema posee como base de datos un libro codificado.

Identificación por métodos moleculares: Se han utilizado sondas para la toxina A en la identificación de aislados de *C. difficile*, también se ha usado la PCR para amplificar el gen de la enterotoxina A de este microorganismo. Igualmente se ha aplicado esta técnica en la detección de otros anaerobios, como *P. gingivalis*, *Mobiluncus* sp, *B. fragilis*.(6, 11)

En la figura 26 se resumen los pasos a seguir para el aislamiento e identificación de bacterias anaerobias.

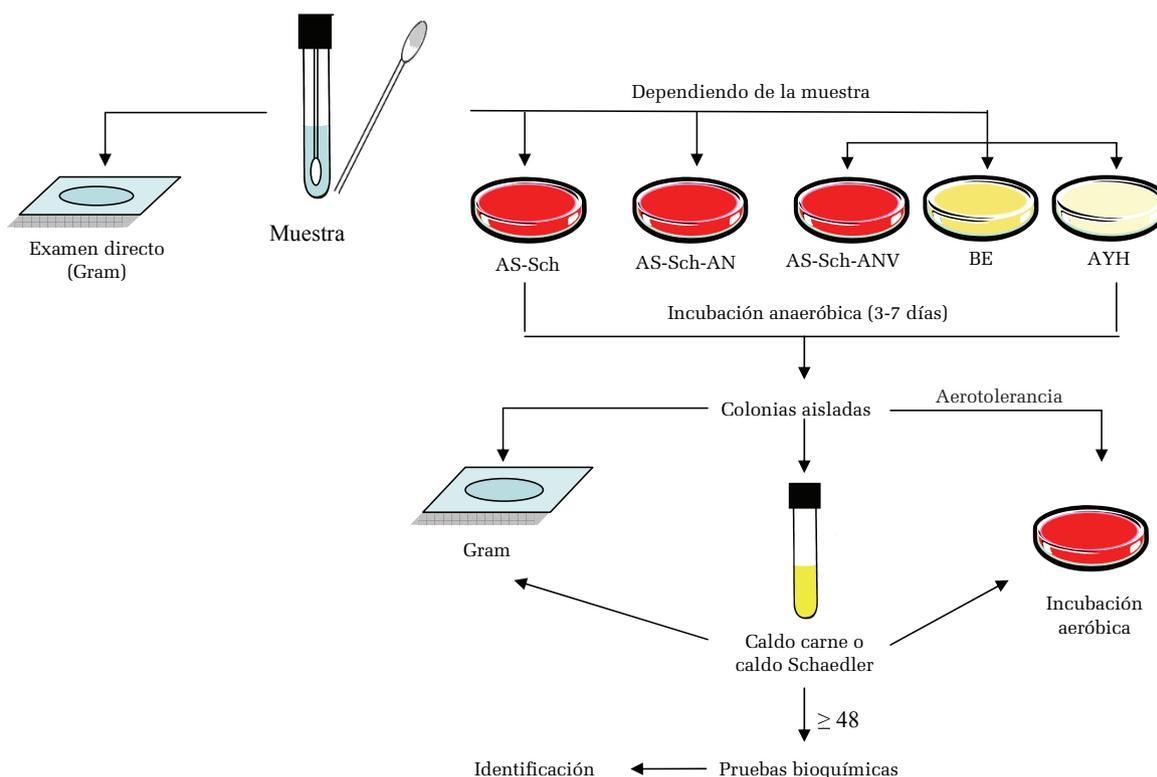


Figura 26. Aislamiento e identificación de bacterias anaerobias

El diagnóstico de las infecciones anaeróbicas se puede predecir por el reconocimiento de ciertos signos clínicos, los cuales se resumen en la tabla 33. Aunque mucho de estos indicios no son específicos, la presencia de más de uno de ellos en un paciente

puede ser sugestivo de una infección anaeróbica. Las condiciones predisponentes e indicios bacteriológicos alertaran al clínico, quien puede entonces, verificar la naturaleza del patógeno y la extensión de la infección.

TABLA 33. Indicios clínicos que sugieren una infección anaeróbica

- Infección adyacente a una superficie mucosa.
- Mal olor de la lesión o secreción.
- Tejido necrótico gangrenoso, gas, formación de absceso.
- Bacteremia o endocarditis sin crecimiento en hemocultivos aeróbicos.
- Infección relacionada con el uso de antibióticos efectivos solo contra aerobios (ej. ceftazidima, aminoglucósidos).
- Infección relacionada con tumores.
- Tromboflebitis séptica.
- Infección seguida a mordeduras animal o humana.
- “Gránulos de azufre” en la secreción.
- Condición clínica que predispone a una infección anaeróbica (Ej. amnionitis maternal, perforación del intestino)

Un número de hallazgos bacteriológicos son también sugestivos de infección anaeróbica, los cuales se resumen en la Tabla 34. Casi todas las infecciones anaeróbicas se originan de la propia microflora del paciente.

TABLA 34. Hallazgos bacteriológicos que sugieren una infección anaeróbica

- Cultivos aeróbicos negativos de microorganismos vistos en la tinción de Gram del material original
- Morfología típica para anaerobios en la tinción de Gram.
- Crecimiento anaeróbico en medios que contienen antibióticos que inhiben aerobios
- Crecimiento negativo en cultivos bacteriológicos de rutina
- Crecimiento positivo en zona anaeróbica de medios líquidos
- Gas, mal olor en la muestra o cultivo anaeróbico
- Características de las colonias en cultivo anaeróbico

Secuencia de la identificación de bacterias anaerobias

1. Extensiones del espécimen clínico teñidos con la coloración de Gram.
 - 1.1. Celularidad y presencia del polimorfonucleares (PMN).
 - 1.2. Presencia de flora bacteriana, morfotipos y abundancia.

Reporte al clínico informando estos datos

2. Identificación presuntiva (I y II Nivel)(Tablas 35 y 36).
 - 2.1. Características morfológicas de las colonias aisladas.
 - 2.2. Resultados del Gram hecho a las colonias.
 - 2.3. Efecto selectivo de algunos antibióticos (kanamicina, colistin, vancomicina entre otros) sobre el crecimiento bacteriano.

Reporte al clínico informando género probable (Anexo 2)

3. Identificación definitiva (III Nivel)
 - a) Pruebas de fermentación.
 - b) Producción de catabolitos: Indol, H₂S, Nitritos, Hidrólisis de gelatina, de la esculina, etc.
 - c) Detección de productos terminales de fermentación por cromatografía de gases.

Reporte al clínico informando género o especie identificada (Anexo 2)

TABLA 35. Nivel I de identificación de grupo y especies de organismos anaerobios Gram negativos.

Microorganismo	pigmento	Kanamicina (1 mg)	Vancomicina (5 mg)	Colistin (10 g)	Crecimiento en bilis 20%	Requerimiento F/F	Nitrato	Indol	Catalasa	Lipasa	Ureasa	Motilidad
Grupo <i>B. fragilis</i>	-	R	R	R	R	-	-	V	V	-	-	-
Grupo <i>B. urealyticus</i>	-	S	R	S	S	+	+	-	++	-	V	V
<i>B. gracilis</i>	-	S	R	S	V	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. urealyticus</i>	-	S	R	S	S	+	+	-	++	-	+	-
<i>Wolinella / Campylobacter</i>	-	S	R	S	S	+	+	-	-	-	-	+
<i>Bilophila</i> sp.	-	S	R	S	R	-	+	-	+	-	++	-
<i>Fusobacterium</i> sp.	-	S	R	S	V	-	-	V	-	V	++	-
<i>F. necrophorum</i>	-	S	R	S	SR	-	-	+	-	+	-	-
<i>F. nucleatum</i>	-	S	R	S	S	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. mortiferum/varium</i>	-	S	R	S	R	-	-	++	-	++	-	-
<i>Porphyromonas</i> sp.	+	R	S	R	S	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella</i> sp. Pigmentada	+	R	R	V	S	-	-	V	-	V	-	-
<i>P. intermedia</i>	+	R	R	S	S	-	-	+	-	+	-	-
Otras <i>Prevotella</i> sp.	-	R	R	V	S	-	++	++	++	++	-	-
Cocos gramnegativos	-	S	R	S	S	-	V		V	V	-	-
<i>Veillonella</i> sp.	-	S	R	S	S	-	+	-	++	++	-	-

R: Resistente; S: Sensible; V: Variable; F/F: Formato/Fumarato.

TABLA 36. Nivel II de identificación de grupo y especies de organismos anaerobios Gram positivos																	
Microorganismos	Morfología celular	Test espora	Kanamicina (1mg)	Vancomicina (5 mg)	Colistin (10 mg)	SPS	Indol	Nitrato	Catalasa	Estimulación arginina	Lecitinasa	Fluorescencia roja	Test CAMP reversa	Forma de carro	Zona doble hemólisis	Ureasa	Col. Amarillas sobre CCFA
Cocos anaerobios GP	C	-	V	S	R	V	V	- +	V								
<i>P. anaerobius</i>	C/ CB	-	RS	S	R	S	-	-	-								
<i>P. assaccharolyticus</i>	C	-	S	S	R	R	+	-	++								
<i>P. hydrogenalis</i>	C	-	S	S	R	R	+	-									
<i>Clostridium sp. Naegler-positiva</i>	B	+	V	SR	R		V	V	-		V						
<i>Clostridium sp.</i>	B	+	S	S	R		V	V	-		+						
<i>C. perfringens</i>	B	+	S	S	R		-	V	-		+		+	+	+	-	
<i>C. bifermentans</i>	B	+	S	S	R		+	-	-		+		-	-	-	-	
<i>C. sordelli Naegler-negativa</i>	B	+	S	S	R		+	-	-		+		-	-	-	+	
<i>Clostridium sp.</i>	B	+	V	SR	R		V	V	-		V	V					
<i>C. difficile</i>	B	+	S	S	R		-	-	-		-	-					+
Bacilos no esporulados	CB/ B	-	S	SR	R		V	V	V								
<i>P. acnes</i>	B	-	S	S	R		+-	+	+								
<i>E. lentum</i>	CB/ B	-	S	S	R		-	+	+-	+		V					

C: Cocos; CB: Cocobacilos; B: Bacilos; V: Variable; S: Sensible; R: Resistente; CCFA: cicloserina cefoxitin fructosa agar; SPS: Sodio Polianetol sulfonato.

12 Actividad práctica

Materiales

- Cultivo primario de una muestra proveniente de una paciente con infección periodontal inoculada en agar sangre base Schaedler.
- Cultivo primario de una muestra proveniente de un paciente con una infección abdominal inoculada en agar sangre Schaedler selectivo y en agar bilis esculina
- Coloración de Gram.
- Pruebas bioquímicas y reactivos para la lectura.
- Cultivo en agar sangre base agar Schaedler de especies conocidas de anaerobios.

Procedimiento

Inspeccione y anote las características morfológicas y microscópicas de las distintas colonias desarrolladas en el cultivo primario.

Características de cultivo

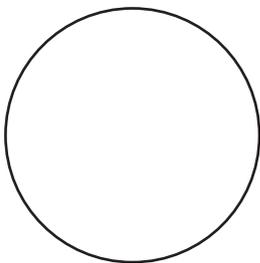
a) _____

b) _____

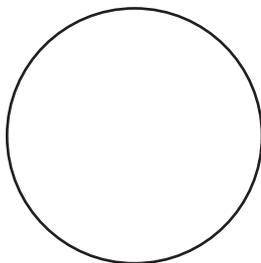
c) _____

d) _____

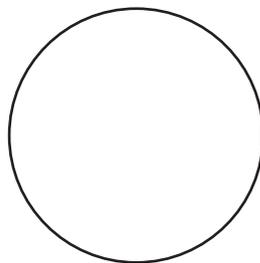
Características microscópicas



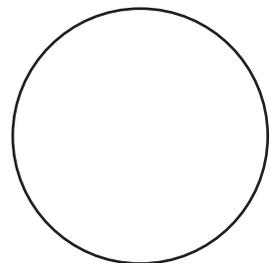
a



b



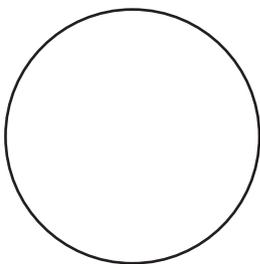
c



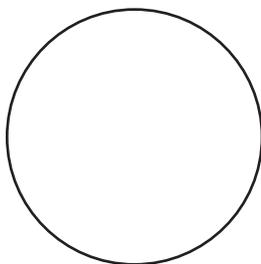
d

Inspeccione y anote las características macroscópicas y microscópicas de las cepas en estudio crecidas en agar sangre.

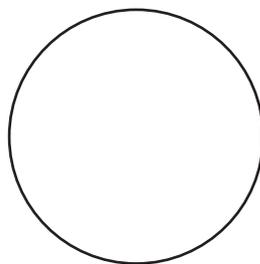
Características microscópicas



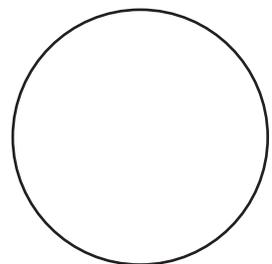
a



b



c



d

5. Mencione las muestras adecuadas para el diagnóstico de una infección anaeróbica según su localización
6. Nombre los medios selectivos y no selectivos para el aislamiento de bacterias anaerobias, especificando su uso
7. Nombre los métodos utilizados para la identificación de bacterias anaerobias, dé ejemplos.
8. Mencione las precauciones a seguir para aislar con éxito bacterias anaerobias.
9. Describa las diferencias entre los procedimientos a seguir para el aislamiento de bacterias aerobias y anaerobias.

Bibliografía

- (1) Brook I. Urinary tract and genito-urinary suppurative infections due to anaerobic bacteria. *Int J Urol* 2004; 11(3): 133-41.
- (2) Chow AW. Anaerobic infections. <http://www.nedscape.com/viewarticle/502835;03-05-05>.
- (3) Espinoza Y, Nieves B, Quintana A. Aerobic and anaerobic bacteria in diabetic foot disease. *Anaerobe* 1999; 5:405-407
- (4) Jousimies-Somer H, Summanen P. Recent taxonomic changes and terminology update of clinically significant anaerobic gram negative bacteria. *CID* 2002; 35 (1):S17-S21.
- (5) Levison ME. Anaerobic pleuropulmonary infections. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14 (2): 187-191.
- (6) Miki T, Kuwahara T, Nakayama H, Okada N, Kataoka K, Arimochi H et al. Simultaneous detection of *Bacteroides fragilis* group species by leuB-directed PCR. *J Med Invest* 2005; 52 (1-2):101-108.
- (7) Moreno M, Romero P, Nieves B, Salazar M, Burguera L. Microbiological characteristics of adult periodontitis associated with anaerobic bacteria. *Anaerobe* 1999; 5: 261-262.
- (8) Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Tenover R. (Ed). *Manual of Clinical Microbiology*. 7ª ed. Washington, DC: ASM. Press; 1999.
- (9) Nieves B. En: Araque M., Nieves B., Sánchez K., Velásquez A., Velazco E., Vizcaya L. *Manual Práctico de Bacteriología*. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia, Escuela de Bioanálisis, Departamento de Microbiología y Parasitología, Cátedra de Bacteriología Clínica. 1999.
- (10) Verma P. Laboratory diagnosis of anaerobe pleuropulmonary infections. *Semin. Respir Infect* 2000; 15 (2): 144-148.
- (11) Smola SF, Rettenberger G, Slimmet T, Burysek L. Comparison of sample collection methods for the PCR detection of oral anaerobic pathogens. *Lett Appl Microbiol* 2003; 36 (2):101-105.

Anexo 1. Ficha de registro de datos

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
DPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Nº Lab.: _____

Nombre y apellido: _____ Edad: _____ Sexo: _____
Procedencia: _____ Nº de historia: _____ Servicio: _____
Fecha de toma de muestra: _____ Tipo de muestra: _____
Examen solicitado: _____ Diagnóstico: _____
Resumen de la historia clínica: _____

Recibe antibióticos: _____ Especifique droga y última dosis: _____
_____ Tiene cultivo anterior: _____
Especifique tipo de muestra y resultado: _____

Observaciones: _____

Medico solicitante: _____ Firma: _____

Anexo 2. Reporte de resultados

Nombre y apellidos: _____
Fecha de toma de muestra: _____ Fecha de emisión: _____
Tipo de muestra: _____ Examen realizado: _____
_____ Médico tratante: _____
Examen directo (técnica utilizada): _____

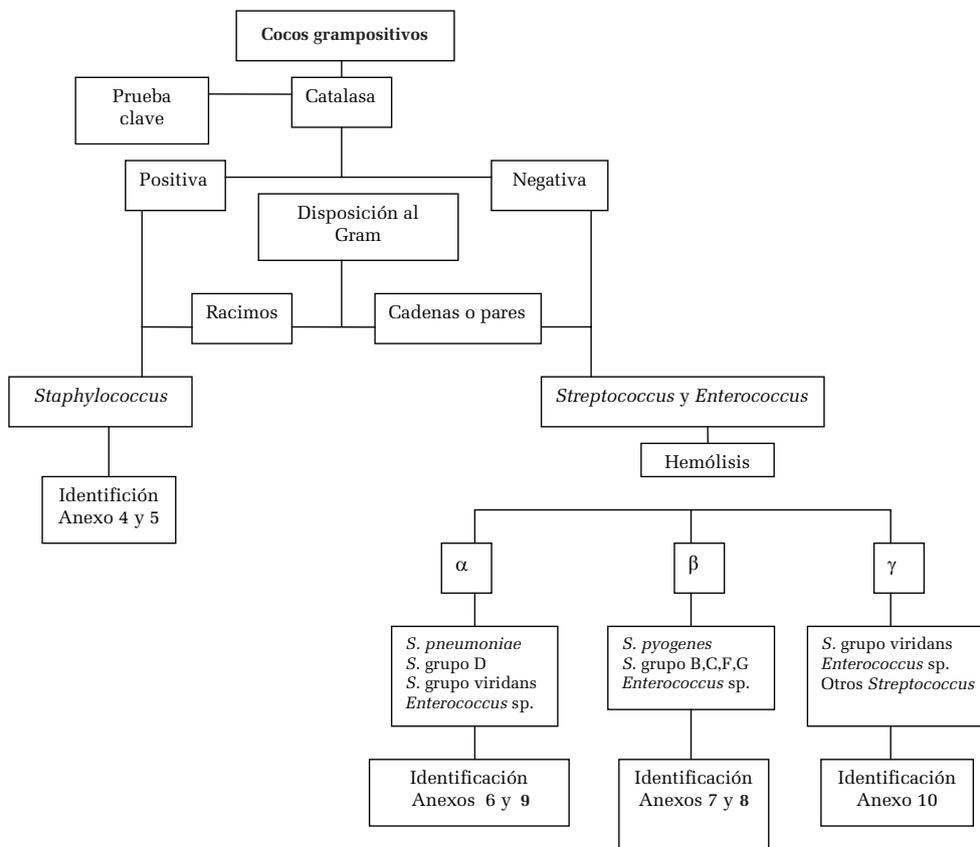
Cultivo: _____

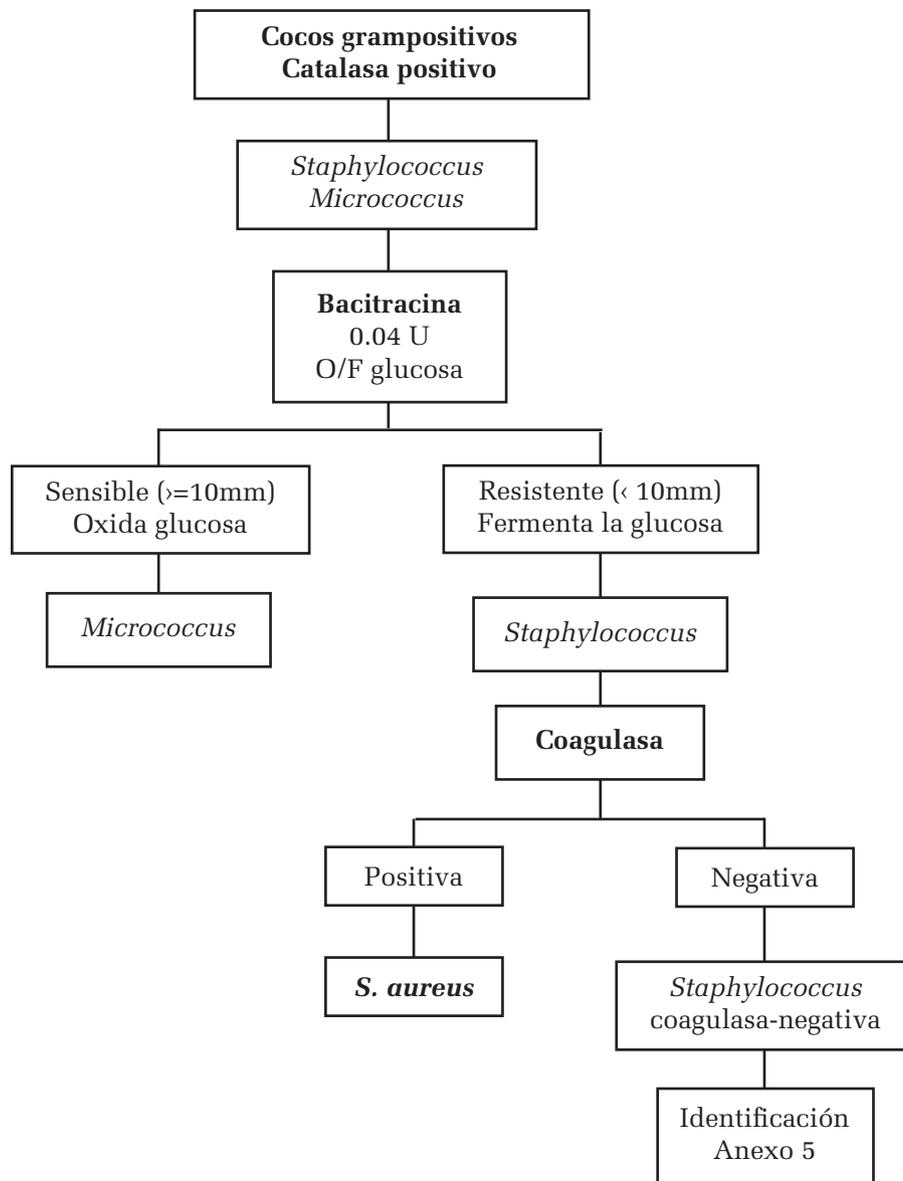
Antibiograma: _____

Observaciones: _____

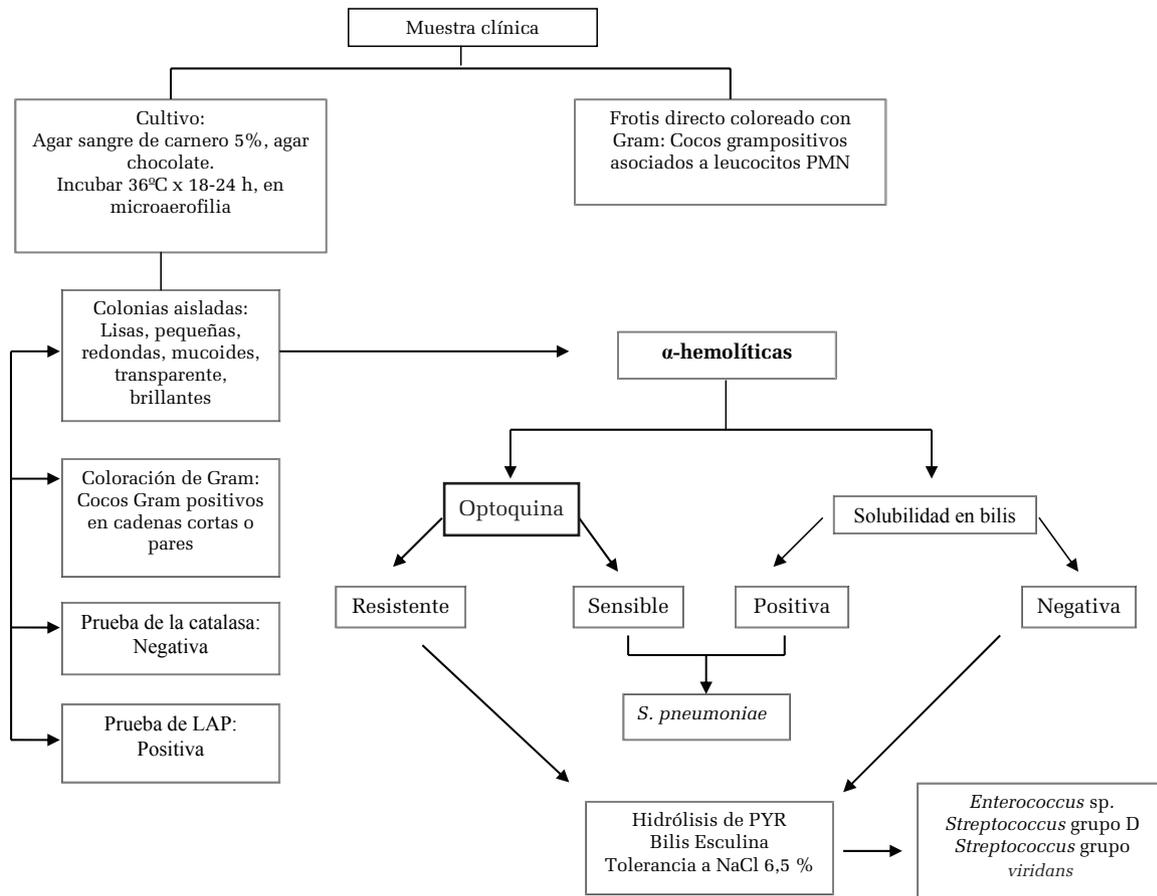
Firma y sello

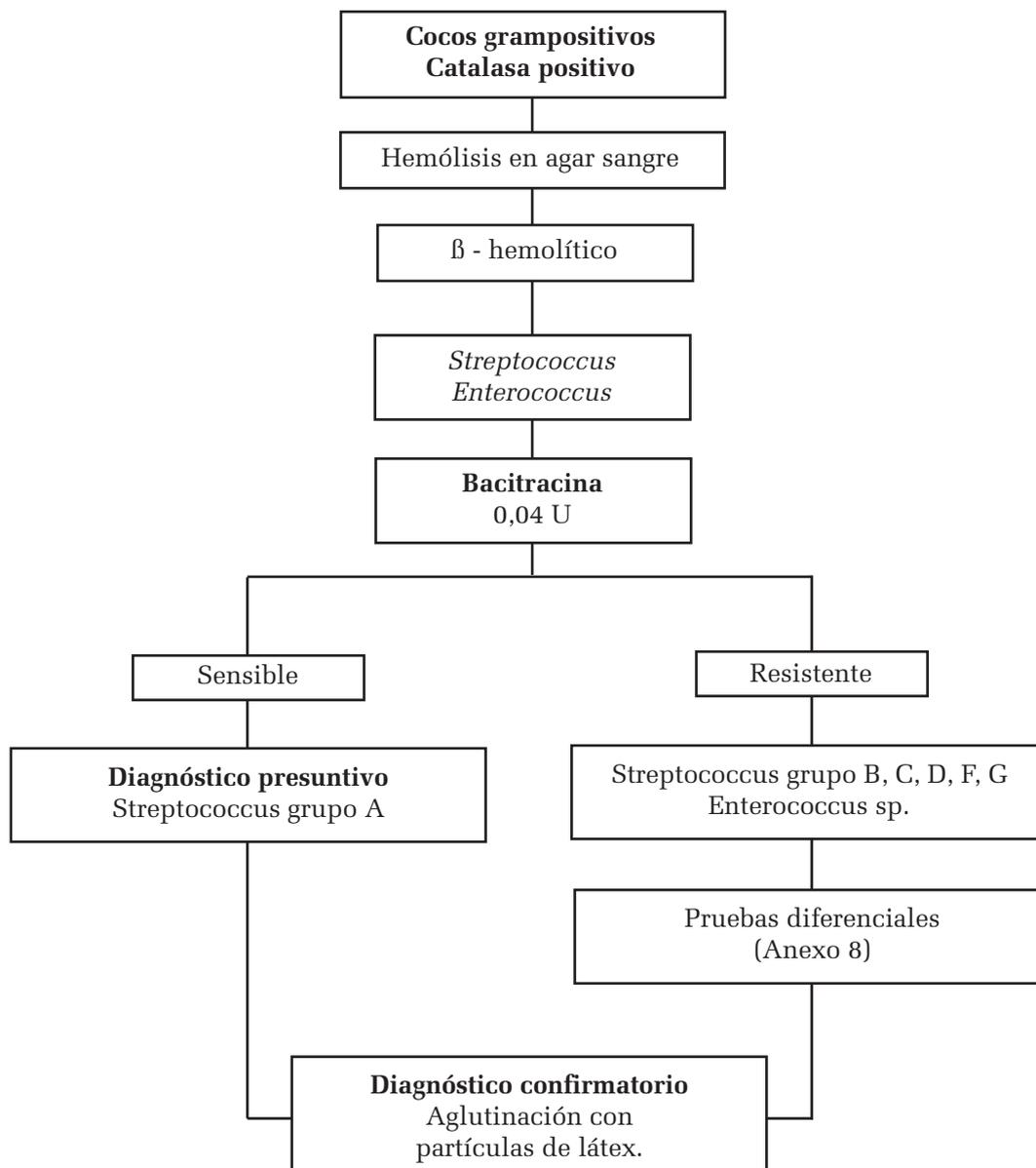
Anexo 3. Esquema de identificación de cocos grampositivos



Anexo 4. Esquema de identificación de *Staphylococcus aureus*

Anexo 6. Esquema de identificación de *Streptococcus pneumoniae*



Anexo 7. Esquema de identificación de *Streptococcus pyogenes*

Anexo 8. Identificación de cocos grampositivos, catalasa negativa, β -hemolíticos

Microorganismo	A	SXT	CAMP	Hidrólisis del hipurato	PYR	Bilis Esculina	Des. en NaCl 6,5%
<i>Streptococcus</i> Grupo A	S	R	-	-	+	-	-
<i>Streptococcus</i> Grupo B	R	R	+	+	-	-	-
<i>Streptococcus</i> Grupo C,F,G	V	S	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	R	R	-	V	+	+	+

A = Taxo de bacitracina de 0.04U; Des. Desarrollo; + = reacción positiva; - = reacción negativa; S = sensible; R = resistente; V = variable; SXT = trimetropina-sulfametoxazole; PYR = pirrolidonil-betanaftilamida.

Tomado de: Koneman y col., 1999.

**Anexo 9. Identificación de cocos grampositivos, catalasa negativa,
α-hemolíticos.**

Microorganismo	O ^a	Solubilidad en bilis ^b	Bilis Esculina	NaCl 6,5%	PYR
<i>S. pneumoniae</i>	S	+	-	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	R	-	+	+	+
<i>Streptococcus</i> grupo D	R	-	+	-	-
<i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i> *	R	-	V	-	-

O = optoquina; + = positivo; - = negativo; V = variable;

^a = sembrar en placas de agar sangre con un hisopo estéril en cuatro direcciones, en un cuadrante de la placa y colocar el taxo de optoquina (P), incubar a 37°C en microaerofilia durante 18 a 24 h. S = sensible (halo > 14 min); R = resistente (crecimiento no inhibido alrededor del disco y halo < 14 min);

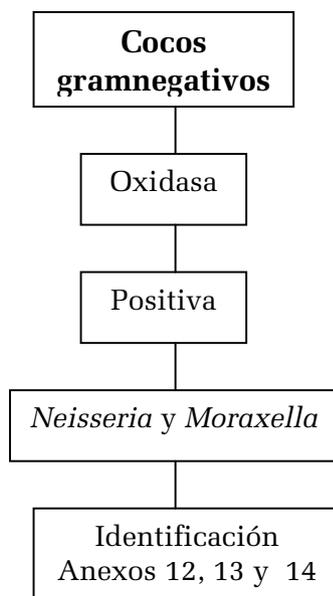
^b = Sembrar en placas de agar sangre después de la incubación respectiva, agregar una gota de desoxicolato de sodio al 2%. Lectura 30' (positivo = hidrólisis de colonias donde se agregó el reactivo; negativo = no se observa cambio en el crecimiento.); PYR = pirrolidonil-betanaftilamida.

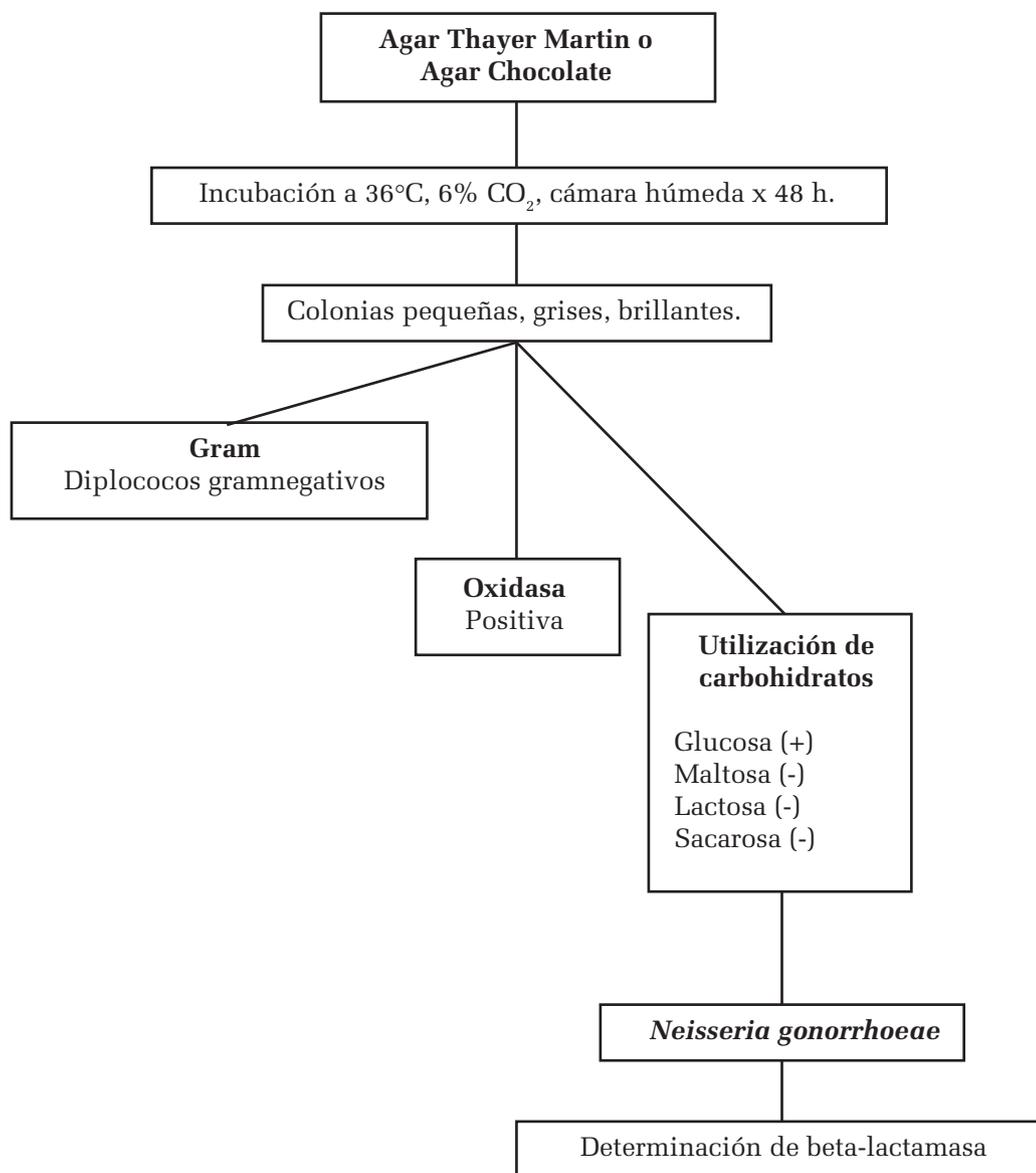
Anexo 10. Identificación de cocos grampositivos, catalasa negativa, γ -hemolíticos

Microorganismo	Bilis esculina	NaCl 6,5 %
<i>Enterococcus</i> sp.	+	+
<i>Streptococcus</i> grupo D	+	-
Otros <i>Streptococcus</i>	-	-

+ = positivo; - = negativo.

Anexo 11. Esquema de identificación de cocos gramnegativos



Anexo 12. Esquema de identificación de *Neisseria gonorrhoeae*

Anexo 13. Identificación de cocos gramnegativos

Microorganismo	Glucosa	Maltosa	Fructosa	Sacarosa	Lactosa	DNasa	Crecimiento AN	Reducción de nitratos
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. catarrhalis</i>	-	-	-	-	-	+	+	+

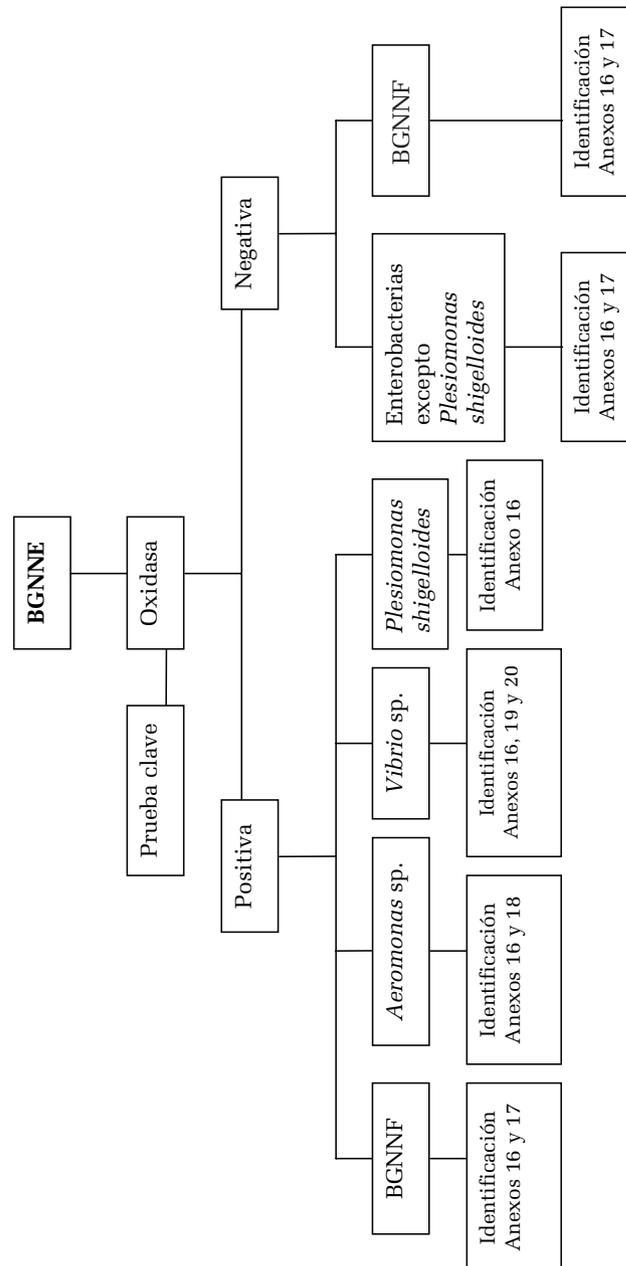
+ = positivo; - = negativo; AN = agar nutriente. Para los azúcares se utiliza el agar CTA.

Anexo 14. Identificación de *Moraxella catarrhalis*

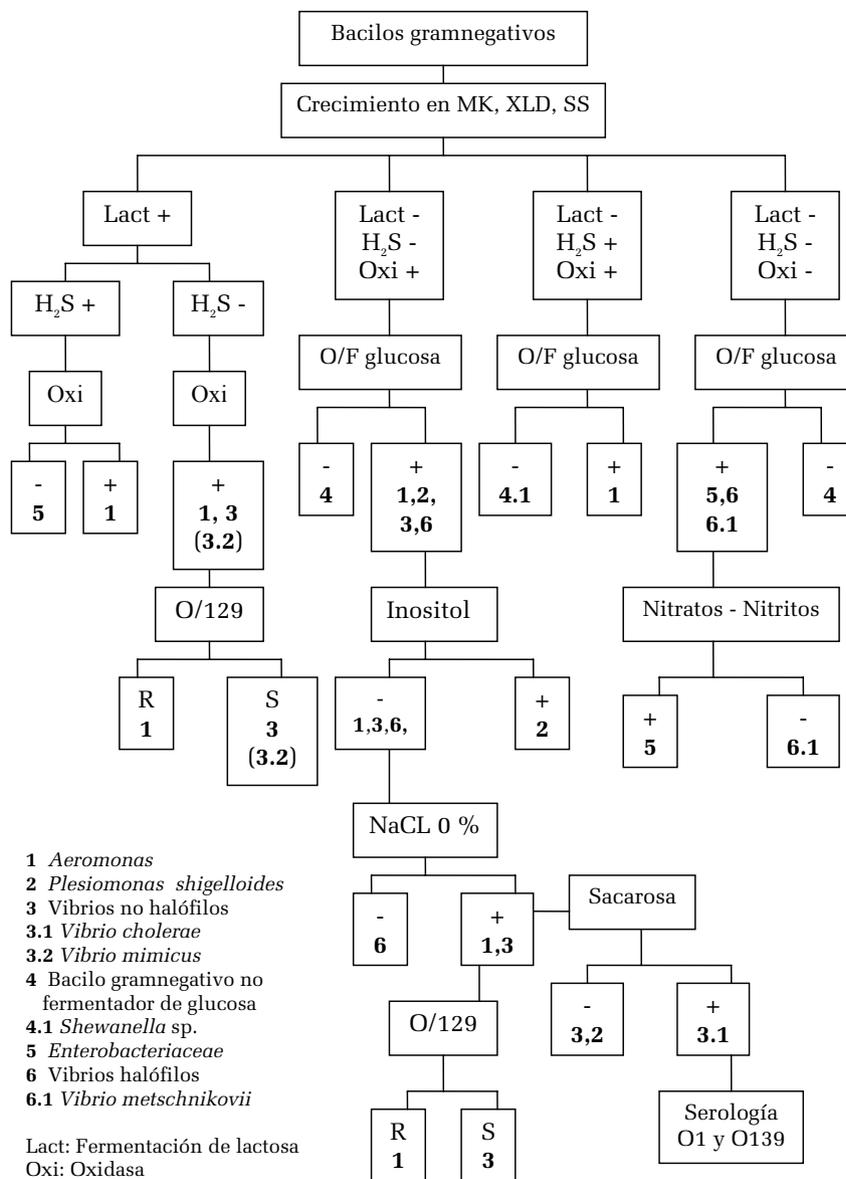
Prueba	Reacción
Morfología y reacción al Gram	Diplococos gramnegativos
Catalasa	+
Oxidasa	+
Motilidad	-
Desarrollo en agar nutritivo	+
Producción de ácido a partir de:	
Glucosa	-
Lactosa	-
Maltosa	-
Sacarosa	-
DNasa	+
Butirato-esterasa	+
β - galactosidasa	-

Tomado de: Koneman y col., 1999.

Anexo 15. Esquema de identificación de bacilos gramnegativos no exigentes (BGNNE)



Anexo 16. Esquema general para identificación de algunos bacilos gramnegativos no exigentes (BGNNE)



- 1 *Aeromonas*
- 2 *Plesiomonas shigelloides*
- 3 Vibrios no halófilos
- 3.1 *Vibrio cholerae*
- 3.2 *Vibrio mimicus*
- 4 Bacilo gramnegativo no fermentador de glucosa
- 4.1 *Shewanella* sp.
- 5 *Enterobacteriaceae*
- 6 Vibrios halófilos
- 6.1 *Vibrio metschnikovii*

Lact: Fermentación de lactosa
 Oxi: Oxidasa
 O/F: Oxidación/Fermentación
 H₂S: Sulfuro de hidrógeno
 S: Sensible
 R: Resistente

Tomado y modificado de: Vizcaya y col., 1994.

Anexo 17. Identificación de bacilos gramnegativos no exigentes (BGNNE)

Microorganismo	C. en MK	Oxi.	Lact	Gluc	Gas	H ₂ S	Deam. Lis.	Deca. Lis.	Mot.	Ind.	Orn	Cit.	Urea	42 °C	O/F Gluc	O/F Xil	O/F Mal
Enterobacterias																	
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+				
<i>Enterobacter arogenes</i>	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-				
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+				
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	+	+	+/-	+	+	-	+	+	-	-	+				
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-/+	+	+	+	-	-	+/-	-	+/-	+	+				
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-				
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-				
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-				
BGNNE																	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+/-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+/-	+	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+/-	+	-
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+/-	-	-

MK: Agar Mac Conkey; Oxi: Oxidasa; Lact: Fermentación de lactosa; Gluc: Fermentación de glucosa; Deam Lis: Deaminación de Lisina; Deca Lis: Decarboxilación de Lisina; Mot: Motilidad; Ind: Producción de Indol; Orn: Decarboxilación de Ornitina; Cit: Utilización del citrato; 42 °C: Crecimiento a 42 °C; O/F: Oxidación/Fermentación; Xil: Fermentación de xilosa; Mal: Fermentación de maltosa; BGNNE: Bacilos gramnegativos no fermentadores.

Tomado de Koneman y col., 1999.

Anexo 18. Identificación de las especies de *Aeromonas* consideradas de importancia clínica

Característica	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	<i>A. jandaei</i>	<i>A. schubertii</i>	<i>A. trota</i>
Indol	+	+	+				+
Gas de glucosa	+	-	+	+	+	-	+
Arginina dihidrolasa	+	+	+	+	+	-	+
Decarboxilación de:							
Lisina	+	-	+	+	+	-	+
Ornitina	-	-	-				-
Voges-Proskauer	+	-	+	+	+	+	-
Ácido de:							
L-arabinosa	+	+	-	-	-	-	-
Lactosa	-	+	-	-	ND	-	ND
Sacarosa	+	+	+	+	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+	-	-	+
Salicina	+	+	-	+	-	-	-
Celobiosa	V	+	V	V	-	-	+
Hidrólisis de Esculina	+	+	-	+	-	-	-
Beta hemólisis en sangre de carnero	+	-	+	+	+	V	V
Sensibilidad a:							
Cefalotina	-	-	+	+	-	+	-
Ampicilina	-	-	-	-	-	-	+
Susceptibilidad a O/129							
10 µg	-	-	-	-	-	-	-
150 µg	-	-	-	-	-	-	-

+: Positivo; -: Negativo; V:Variable; ND: dato no disponible;
bv: biovariedad

Tomado de: Castro y col., 2003.

Anexo 19. Ocho pruebas diferenciales clave para dividir las 12 especies clínicamente significativas de Vibrio en seis grupos.

Prueba	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3		Grupo 4		Grupo 5		Grupo 6	
	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. carchariae</i>
Des. en caldo nutritivo:	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sin NaCl	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Con 1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nit → Nit	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	-	-	V	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Lisina	+	+	V	V	-	V	-	-	+	+	+	+
Ornitina	+	+	-	-	-	-	-	-	V	+	V	-

-: Prueba negativa; +: Prueba positiva; V: Variable. Decarboxilación de Arginina, Lisina y Ornitina; Nit: Reducción de Nitratos a Nitritos; Inositol: Fermentación de Inositol; Des.: Desarrollo.

Tomado de Koneman y col., 1999.

Anexo 20. Diferenciación entre biotipos de *Vibrio cholerae*

Prueba	Biotipo	
	Clásico	El Tor
Betahemólisis en agar sangre de carnero	-	+
Prueba CAMP	-	+
Prueba de Voges-Proskauer	-	+
Aglutinación de eritrocitos de pollo	-	+
Sensibilidad a 50 U de Polimixina B	S	R
Sensibilidad al fago IV	S	R

R: Resistente; S: Sensible; - : Prueba negativa; + : Prueba positiva.

Tomado de: Koneman y col., 1999.

Anexo 21. Identificación de *Arcanobacterium haemolyticum*

Nombre de la prueba	Reacción
Morfología y reacción al Gram	Bacilos grampositivos
Hemólisis	Beta
Catalasa	-
CAMP reverso	+
Hidrólisis de la Esculina	-
Reducción de nitratos	-
DNAsa	+
Glucosa	+
Maltosa	+
Sucrosa	V
Manitol	-
Xilosa	-
Ureasa	-

+: positivo; -: negativo; V: variable

Tomado de: Koneman y col., 1999; Lopardo y col., 1999.

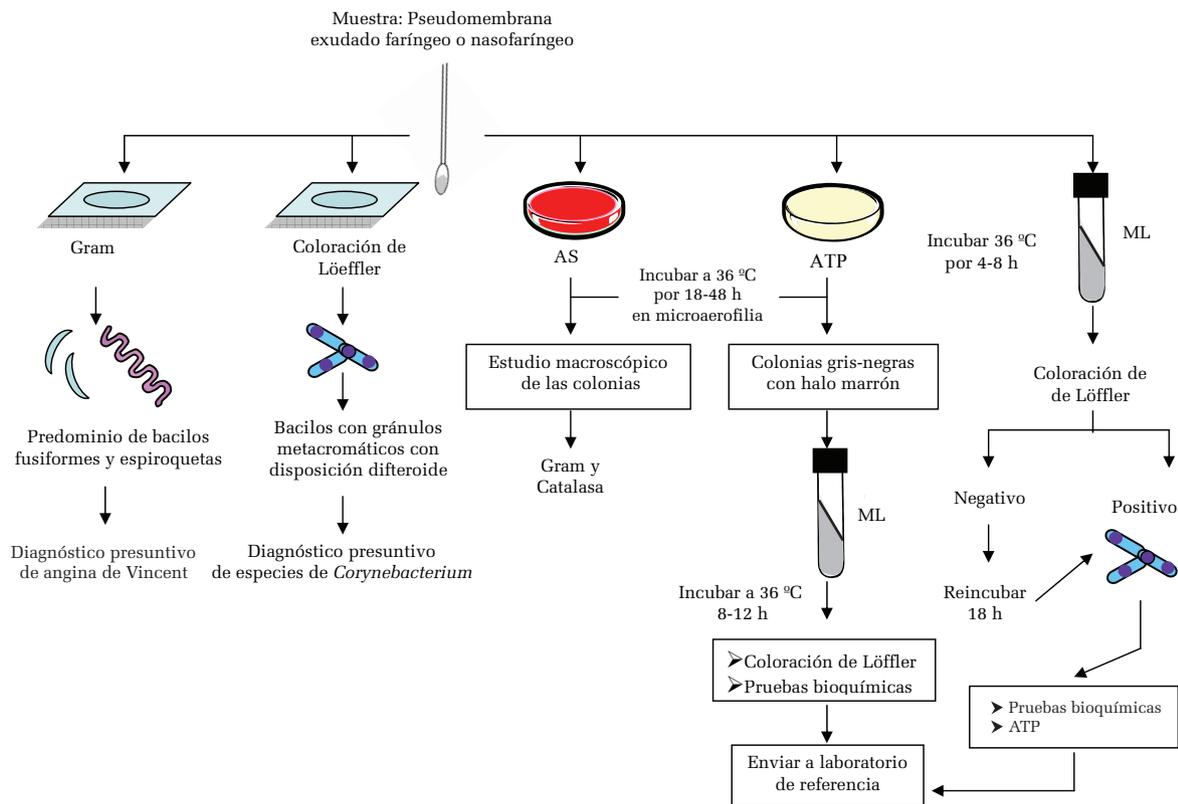
Anexo 23. Características de las especies de *Haemophilus* aisladas del ser humano

Especie	Factor V	Factor X	Ureasa	Indol	Ácido a partir de		β -hemólisis	Catalasa
					Glucosa	Lactosa		
<i>H. influenzae</i>	+	+	+/-	+/-	+	-	-	+
<i>H. parainfluenzae</i>	+	-	+/-	-	+	-	-	+/- (lento)
<i>H. haemolyticus</i>	-	+	+	+/-	+	-	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>H. segis</i>	+	-	-	-	-	-	-	+/- (lento)
<i>H. aegypticus</i>	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>H. ducreyi</i>	-	+	-	-	+/-	-	-	-

Requerimiento de factor V; Requerimiento de factor X

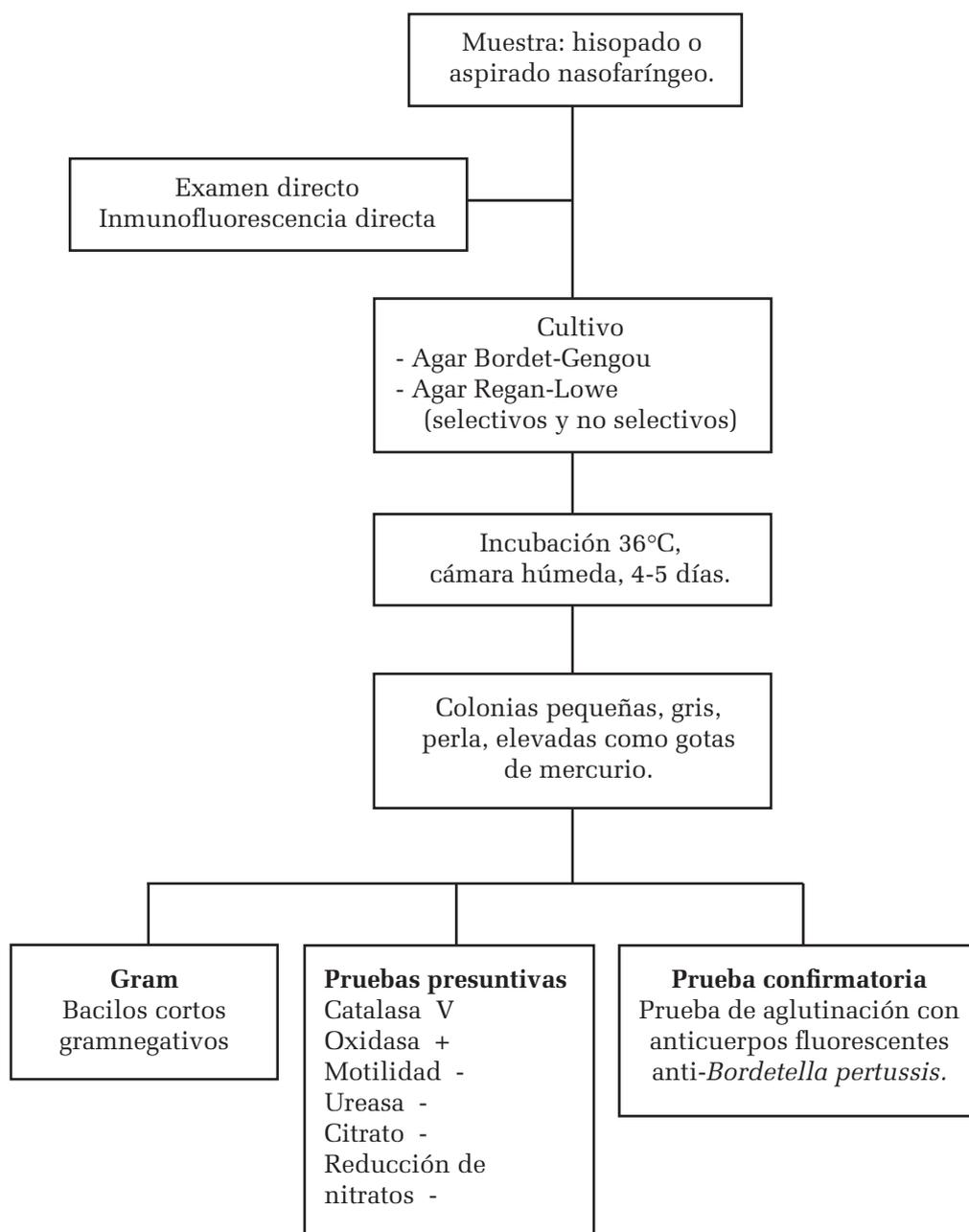
Tomado de: Finegold S. y Baron E., 1989

Anexo 24. Procedimiento para el diagnóstico microbiológico de la difteria

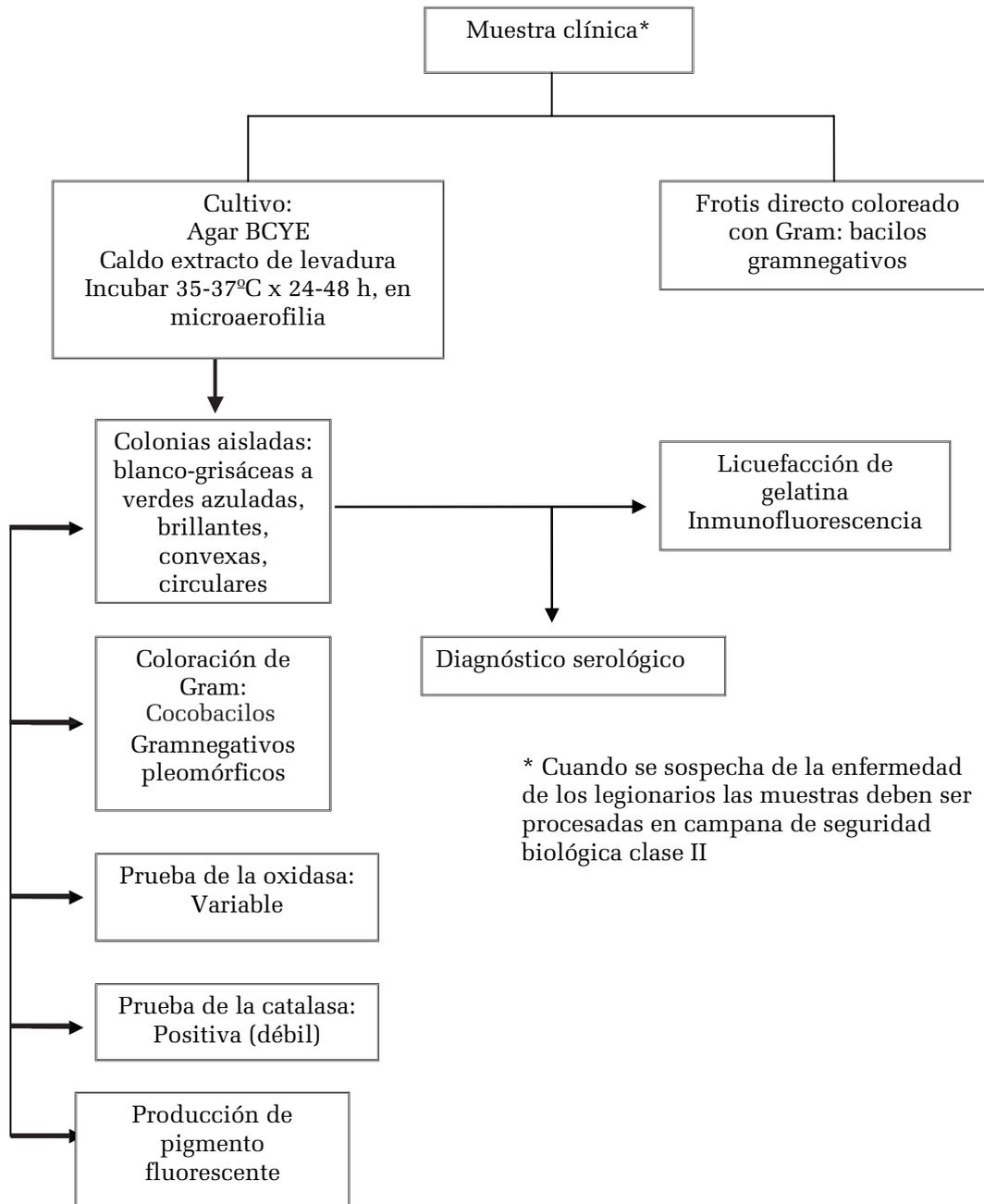


ATP = Agar telurito de potasio; ML = Medio de Loeffler.

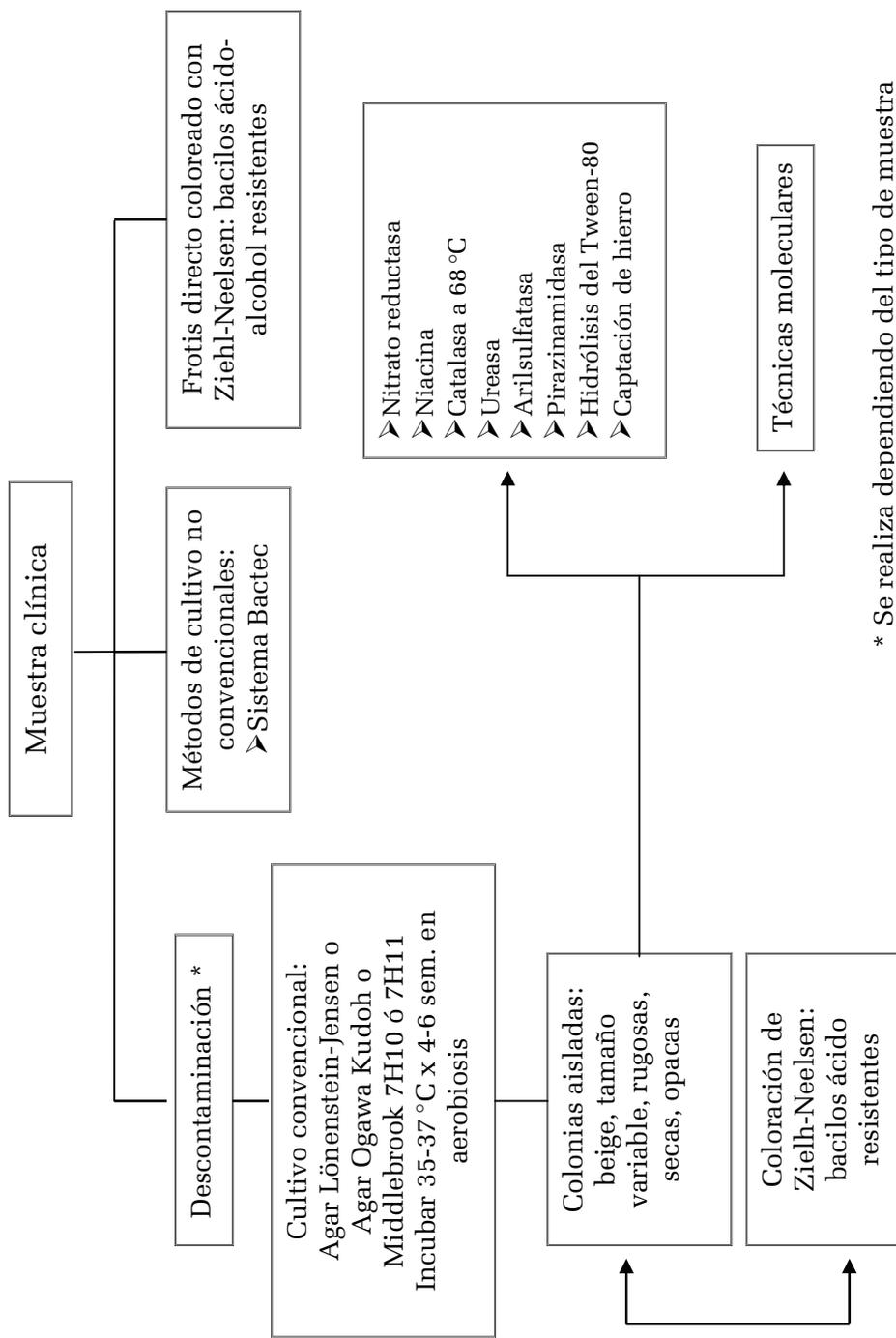
Anexo 25. Esquema de identificación de *Bordetella pertussis*



Anexo 26. Esquema de identificación de *Legionella* sp.



Anexo 27. Esquema de identificación de *Mycobacterium tuberculosis*



* Se realiza dependiendo del tipo de muestra

Anexo 28. Identificación de *Gardnerella vaginalis*

Prueba	Resultado
Morfología y reacción al Gram	Cocobacilos gramvariable
Hemólisis	β - hemolítico
Oxidasa	-
Catalasa	-
Hidrólisis del hipurato	+
Hidrólisis del almidón	+
Glucosa	+
Maltosa	+
Sacarosa	+
Manitol	-
Inhibición con: Metronidazol (50ug) Trimetroprim (5 ug) Sulfonamida (1ug) Polianetol sulfonato de sodio (SPS)	Sensible

+: positivo; -: negativo

Tomado de: Koneman y col., 1999; Montiel y Lam, 2001.

Bibliografía

- (1) Koneman E., Allen S., Jandon W., Schreckenberger P., Winn W. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color. 5ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 1999.
- (2) Lopardo H., Hernández C., Soloaga R. Diagnóstico microbiológico de las Infecciones Respiratorias Bacterianas [en línea] 1999 [fecha de acceso 18 de Abril de 2005]; URL disponible en www.ifcc.org/ria/div/britanis/az_19.htm
- (3) Montiel F, Lam M. Manual de microbiología clínica. Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo; 2001.
- (4) Vizcaya L, Bravo L, Fonte L, Velasco J, Flores A. Diagnóstico de laboratorio de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). Curso teórico-práctico. Sociedad Venezolana de Microbiología, Capítulo de Mérida. XXII Jornadas Venezolanas de Microbiología “Dr. José A. Serrano”. Mérida–Venezuela. 1994.
- (5) Castro G, Aguilera M, Hernández C, Arteaga R, Carmona A, Pérez A, Giono S, Figueras M, Aparicio G. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquímica* 2003; 28(4): 11-18.
- (6) Finegold S, Baron E. Diagnóstico microbiológico Bayley Scout. 7a ed. Argentina: Editorial médica Panamericana; 1989.

Glosario

A/A: Ácido/Ácido, Fermentación de lactosa y glucosa
AMK: Agar MacConkey
AMS: Agar manitol salado
AMT: Amplificación mediada por transcriptasa
AN: Agar nutritivo
APA: Agua peptonada alcalina
AS: Agar sangre
AS-Sch: Agar sangre base Schaedler
ATM: Agar Thayer-Martin
ATP: Agar telurito de potasio
AYH: Agar yema de huevo
BHI: Infusión cerebro corazón
BE: Agar bilis-esculina
CH: Agar chocolate
CIN: Agar Cefsulodin-Irgasan-Novobiocina
CLED: Agar cistina-lactosa-electrolito-deficiente
DIU: Dispositivo intrauterino
DNA-AMP: Agar DNA-ampicilina
EIA: Enzimoimmunoanálisis
IFD: Inmunofluorescencia directa
ITRS: Infecciones del tracto respiratorio superior
K/A: Alcalino/Ácido, no fermenta la lactosa/fermentación de la glucosa
MH: Mueller Hinton
MIO: Agar motilidad-indol-ornitina
ML: Medio Löeffler
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LIA: Agar Lisina hierro
PM: Agar Preston modificado
PMN: Polimorfonucleares
PYR: L-pirrodil-beta-naftilamida
RCP: Reacción en cadena de la polimerasa

RCL: Reacción en cadena de la ligasa
SNC: Sistema nervioso central
SS: Agar *Shigella-Salmonella*
SSF: Solución salina fisiológica
SXT: Trimetoprim sulfametoxazol
TA: Temperatura ambiente
TCBS: Agar Tiosulfato-citrato sales biliares
TH: Caldo Todd Hewitt
TR: Tracto respiratorio
TRI: Tracto respiratorio inferior
TRS: Tracto respiratorio superior
TS: Agar tripticasa soya
UNG: Uretritis no gonocócica
VB: Vaginosis bacteriana
VHS: Virus herpes simple
VPH: Virus papiloma humano
XLD: Agar xilosa-lisina-desoxicolato de sodio

Los autores

Judith Velasco

Licenciada en Bioanálisis. Especialidad en Microbiología Clínica. Profesora asociada, adscrita a la Cátedra de Bacteriología Dpto. de Microbiología y Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

María del Carmen Araque

Médica Cirujana. Magister Scientiae y Doctorado en Ciencias Médicas Fundamentales. Profesora asociada, adscrita a la Cátedra de Bacteriología Dpto. de Microbiología y Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Emma Araujo

Licenciada en Bioanálisis. Bioanalista al Servicio adscrita al Dpto. de Microbiología y Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Aurora Longa

Licenciada en Bioanálisis. Especialidad y Magister Scientiae en Microbiología Clínica. Profesora asistente, adscrita a la Cátedra de Bacteriología Dpto. de Microbiología y Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Beatriz Nieves

Licenciada en Bioanálisis. PhD en Biología mención Microbiología. Profesora titular, adscrita a la Cátedra de Bacteriología Dpto. de Microbiología y Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Ana Carolina Ramírez

Licenciada en Bioanálisis. Magister Scientiae en Microbiología Clínica. Profesora asistente, adscrita a la Cátedra de Bacteriología Dpto. de Microbiología y Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Kiralba Sánchez

Licenciada en Bioanálisis. Especialidad y Magister Scientiae en Microbiología Clínica. Profesora asociada, adscrita a la Cátedra de Bacteriología Dpto. de Microbiología y Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes.

Elsa Velazco

Licenciada en Bioanálisis. Especialidad y Magister Scientiae en Microbiología Clínica. Profesora asociada, adscrita a la Cátedra de Bacteriología Dpto. de Microbiología y Parasitología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Índice

7	Prefacio
1	práctica
9	Principios diagnósticos de las enfermedades infecciosas
2	práctica
25	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana
3	práctica
31	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior
4	práctica
47	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio inferior
5	práctica
65	Diagnóstico microbiológico de las infecciones óticas
6	práctica
79	Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares
7	práctica
91	Diagnóstico microbiológico de las Infecciones del Tracto Urinario (ITU). Urocultivo
8	práctica
103	Diagnóstico microbiológico de la Enfermedad Diarreica Aguda (EDA). Coprocultivo
9	práctica
119	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del aparato circulatorio. Hemocultivo
10	práctica
129	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. Líquido Cefalorraquídeo (LCR)
11	práctica
139	Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto genital
12	práctica
157	Diagnóstico microbiológico de las infecciones por bacterias anaerobias
171	Anexos
199	Glosario
201	Los Autores

