870127
24
29

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Elaboración de un Manual de Bacteriología Pediátrica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

GILDARDO RETES ANGULO

A S E S O R :

Q F. B. MA. DEL SOCORRO PULIDO GARCIA

GUADALAJARA, JAL. 1986

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

		Pag.
Lista de abreviaturas		I
Lista de cuadros, esquemas y tablas		II
I.-	INTRODUCCION	1
II.-	GENERALIDADES	3
	A.- Clasificación y nomenclatura	3
	B.- Requerimientos para el desarrollo bacteriano.	7
	C.- Medios de cultivo para un propocito	10
III.-	MATERIAL Y METODOS	15
	Coprocultivo	15
	Urucultivo	20
	Hemocultivo	22
	Exudado faringeo y nasal	26
	Cultivo de liquido cefalorraquideo	31
	Parasitologia	37
	Tecnicas de examenes coproparasitoscopico	42
	Bacilo Acido-Alcohol resistente	46
	Inmunologia	49
	Antiestreptolisinas " O "	51
	V.D.R.L.	54
	Proteina C reactiva	55
	Reacciones febriles	56
	Complemento Hemolitico 50 %	59
IV.-	RESULTADOS Y CONCLUSIONES	63
V.-	BIBLIOGRAFIA	65

LISTA DE ABREVIATURAS

SIM	Sulfhidrico, indol, movilidad
L.C.R.	Liquido Cefalorraquideo
BAAR	Bacilos alcóhol-ácido resistente
ml	mililitro
BHI	Infución cerebro-corazon
mm	milimetros
TXA	Disco impregnado de bacitracina que inhibe el desarrollo de Streptococcus hemolitico del -- grupo A.
TXP	Disco impregnado de etil-hidrocuprína que inhibe el desarrollo de Streptococcus pneumoniae
Hrs.	Horas
mm^2	milimetros cuadrados
Sol.	solución
mg	miligramos
q.p.	quimicamente puro
r.p.m.	revoluciones por minuto
min.	minuto
H2S	ácido sulfhidrico
S.S.A.	Secretaria de Salubridad y Asistencia
GRC	Globulos rojos de carnero
TbS	Tetranol hamina.
mmc.	Milímetro cúbico.

			Pag.
ESQUEMA	1	Ciclos vitales de parásitos, no hay huesped intermediario.....	38
ESQUEMA	2	Ciclos vitales de parásitos, un huesped intermediario.....	38
ESQUEMA	3	Ciclos vitales de parásitos, dos huéspedes intermediarios.....	39
CUADRO	1	Coprocultivo.....	18
CUADRO	2	Bioquímica de microorganismos con mayor frecuencia.....	19
CUADRO	3	Urocultivo.....	22
CUADRO	4	Hemocultivo.....	25
CUADRO	5	Exudado faringeo y nasal.....	30
CUADRO	6	Cultivo de líquido cefalorraquideo.....	33
CUADRO	7	Secreciones y exudados diversos.....	36
CUADRO	8	Antiestreptolisinas en suero.....	53
CUADRO	9	Aglutinación en tubo.....	58
CUADRO	10	Complemento hemolítico 50 %.....	60
CUADRO	11	Complemento hemolítico 50 %.....	61
TABLA	1	Principales familias bacterianas.....	4 y 5
TABLA	2	Principales géneros clasificados por la tinción de Gram.....	6

I . - I N T R O D U C C I O N

Desde la antigüedad, ciertos pensadores, con objeto de explicar la transmisión de un individuo a otro de diversas enfermedades supusie-- ron la existencia de agentes invisibles capaces de transmitir la in-- fección. Lucrecio (96-55 A. de C.) reconoció intuitivamente, no sólo la naturaleza atómica de las sustancias, sino también la existencia - de " semillas " de las enfermedades.

Sin embargo los organismos microscópicos (microbios) no fueron observados hasta que Antony Van Leewenhoek (1632-1723) construyó microscopios con suficiente capacidad de aumento; dando origen a la ciencia de la microbiología, pero ésta como microbiología experimental, evolucionó muy lentamente, ya que los investigadores solo pudieron reconocer la existencia de las distintas variedades de microbios, su distribución y sus principales funciones; pero el desarrollo de métodos seguros y eficaces posiblemente fué estimulado por las ansias de hallar solución a las diferentes infeccio es y por lo tanto a las diferentes enfer edades. Los principales individuos que han intervenido en el - desarrollo de la microbiología han sido sin duda, Pasteur en Francia' y Koch en Alemania.

Los primeros microbios patógenos reconocidos fueron los hongos,cuyo tamaño era mayor que el de las bacterias. En 1836 Agustino Bassi - demostró experimentalmente que un hongo era la causa de una enferme-- dad de los gusanos de seda y Schölein descubrió, tres años más tarde' la asociación de un hongo con una enfermedad cutánea humana, la tiña! favosa.

En 1865, Pasteur penetró en el campo de la microbiología Patogénica con el descubrimiento de un Protozoo; y en 1850, Dacaine, había observado ya cuerpos en formade bastoncillos en la sangre de los corderos enfermos de ántrax, y fué koch, quién aisló el bacilo de ántrax - en cultivo puro y quién perfeccionó las técnicas que aún se emplean - en la actualidad; en éstas se incluyen el uso de medios sólidos en --

los que las células individuales crecen en colonias separadas, Koch introdujo, el empleo de colorantes los cuáles tienen mucha importancia para identificar organismos mucho más pequeños que el bacilo de ántrax, Koch modificó sus propios métodos que lo condujeron a identificar el bacilo de la tuberculosis, formalizó los criterios de -- Henle conocidos como postulados de Koch, para distinguir un agente' patógeno de un microbio accidental; éstos postulados son:

1.- El organismo se encuentra siempre en las lesiones de la - enfermedad.

2.- Puede ser aislado en cultivos puros en medio artificial

3.- La inoculación de éstos cultivos origina un proceso parecido en los animales.

4.- El Agente patógeno puede recuperarse a partir de las lesiones producidas en éstos animales.

Estos criterios han sido muy valiosos para la identificación de los agentes patógenos, aunque no todos se cumplen siempre.

Con la poderosa metodología desarrollada por Koch se inició la - época dorada de la bacteriología médica ya entre 1879 y 1889 la escuela alemana aislaron: el Vibrión colérico, Bacilo Tífico, Bacilo' Diftérico, Meningococo, Gonococo, Bacilo Tetánico, Staphilococcus, --- Streptococcus . A ello siguieron estudios sobre mecanismos patógenicos, las respuestas del huésped y los métodos de prevención y tratamiento.

Este manual pretende introducir a los aspectos más elementales - de la metodología en el aislamiento é identificación de las espe--- cies más comunes que producen la patología humana.

II.- G E N E R A L I D A D E S

A).- CLASIFICACION Y NOMENCLATURA:

La clasificación de las bacterias depende principalmente de su tamaño forma y propiedades de coloración, hay coloraciones especiales utilizadas para ciertos organismos por ejemplo Micobacterias y Corinebacterias . Pero en general, se utiliza la coloración de Gram, éste método fué desarroollado por el bacteriólogo Danés Christian Gram en ---1884. Los organismos Gram positivos, retienen el color violeta inicial, mientras que los organismos Gram negativos son decolorados por' el disolvente orgánico utilizado, presentando la coloración de con---traste; por ejemplo si se usa safranina, dará un color rosa.

En los animales superiores y en las plantas, las homologías morfológicas,fisiológicas y embriológicas,unidas al estudio de los fósiles han permitido establecer esquemas taxonómicos que al parecer corresponden a las relaciones naturales y filogenéticas entre los distintos grupos, no existiendo criterios fidedignos para establecer relaciones filogenéticas,para la clasificación de las bacterias, se hace uso de' numerosas propiedades bacterianas aparte de las ya mencionadas (forma tamaño y propiedades de coloración) se incluyen: color,motilidad,tipo de flagelos,cápsula,morfología colonial,medios de producción,de energía,formación de productos químicos característicos,relaciones ecológicas, las diferentes vías utilizadas para la biosíntesis,nutrición en ésta propiedad se incluye tanto los productos necesarios para el - crecimiento, como la capacidad de las bacterias, para utilizar distintos tipos de azúcares y otros nutrientes.

En la tabla 1 se describen algunas de las principales familias de bacterias, y en la tabla 2 los principales géneros clasificados por la tinción de Gram.

TABLA 1 PRINCIPALES FAMILIAS BACTERIANAS

I. EUBACTERIAS GRAMPOSITIVAS

Forma Celular	Motilidad	Otras características distintivas		Género	Familia
Cocos	Casi todas son permanentemente inmóviles	Células que forman agrupaciones cúbicas.		Sarcina Micrococcus	Microcócácea
		Células organizadas irregularmente.		Staphylococcus	
		Células en cadena, Fermentación láctica de los azúcares.		Streptococcus Diplococcus Leuconostoc	Lactobacilácea
Bastones rectos	Casi todas son permanentemente inmóviles	Fermentación láctica de los azúcares.		Lactobacillus	Lactobacilacea
		Fermentación Pfopiónica de los azúcares.		Propionibacterium	Propionibacteriácea
		Oxidativa, débilmente fermentativa.		Corynebacterium Listeria Erysipelothrix.	Corinebacteriácea
	Móviles, con flagelos perítricos, y formas inmóviles relacionadas	Produccion de endosporas	Aerobias	Bacillus	Bacilácea
			Anaerobias	Clostridium	

II. BACTERIAS GRAMNEGATIVAS, EXCLUYENDO LAS FORMAS FOTOSINTETICAS

Cocos	Permanentemente inmóviles	Aerobios Anaerobios		Neisseria Veillonella	Neisseriácea
				Brucella Pasteurella Hemophilus Bordetella	Bruceláceas.
Bastones rectos	Móviles con flagelos perítricos y formas inmóviles relacionadas	Anaerobios facultativos	Fermentación ácida mixta de azúcares	Escherichia Erwinia Shigella Salmonella	Enterobacteriácea
			Fermentacion de los azúcares por butilenglicol	Enterobacter Serratia	

TABLA 1 PRINCIPALES FAMILIAS BACTERIANAS (Continuación)

Forma Celular	Motilidad	Otras características distintivas		Genero	Familia
		Aerobios	Fijadores libres de nitrógeno	Azotobacter	Azotobacteriácea
			Fijadores simbióticos de nitrógeno	Rhizobium	Rhizobiácea
	Móviles con -- Flagelos polares	Aerobios	Oxidan compuestos = inorgánicos	Nitrosomonas Nitrobacter Thiobacillus	Nitrobacteriácea Thiobacteriacea
			Oxidan compuestos = orgánicos	Pseudomonas Acetobacter	Pseudomonácea
		Anaerobios Facultativos		Photobacterium Zymomonas Aeromonas	
Bastones curvos	Móviles, con = Flagelos polares	En coma En espiral	Aerobios Anaerobios	Vibrio Desulfovibrio Spirillum	Espiriláceas

III. OTROS GRUPOS IMPORTANTES

Características	Genero	Familia (-ácea) Orden (-ales)
Bastones acidorresistentes	Mycobacterium	Actinomicetales
Bastones en forma radiada(actinomicetos)	Actinomyces	
Bastones en forma radiada(Actinomicetos)	Nocardia	
Bastones en forma radiada(actinomicetos)	Streptomyces	
Organismos en espiral, móviles	Treponema Borrelia Leptospira Spirocheta	Spiroquetales
Pleomórficos pequeños, sin pared rígida	Mycoplasma	Micoplasmatácea
Pequeños Parásitos intracelulares	Rickettsia Coxiella	Rickettsiácea
Pequeños parásitos intracelulares, facilmente filtrables	Chlamydia	Clamidiácea
Parásitos intracelulares, que limitan con los protozoos	Bartonella	Bartonelácea

Tabla tomada de Tratado de Microbiología; Davis, Dobelcoo, Eisen, Ginsberg, Wood; Editorial Salvat. 1978. pag. 34, 35 .-

TABLA 2 PRINCIPALES GENEROS CLASIFICADOS POR LA TINCION DE GRAM.

Géneros Grampositivos	Géneros Gramnegativos
Micrococcus	Cardiobacterium
Staphylococcus	Haemophilus
Aerococcus	Bordetella
Pediococcus	Alcaligenes
Gemella	Brucella
Leuconostoc	Branhamella
Peptococcus	Neisseria
Peptostreptococcus	Moraxella
Streptococcus	Acinetobacter
Lactobacillus	Flavobacterium
Erysipelothrix	Pseudomonas
Listeria	Aeromonas
Kurthia	Necrosomas
Corynebacterium	Plesiomonas
Mycobacterium	Vibrio
Nocardia	Beneckea
Bacillus	Campylobacter
Clostridium	Morganella
Eubacterium	Proteus
Actinomyces	Erwinia
Propionibacterium	Hafnia
Rothia	Enterobacter
Arachnia	Klebsiella
Bifidobacterium	Serratia
	Yersinia
	Citrobacter
	Salmonella
	Shigella
	Escherichia
	Bacteroides
	Pasteurella

B).- REQUERIMIENTOS PARA EL DESARROLLO BACTERIANO

Las bacterias pueden ser divididas en autótrofas y heterótrofas - Las primeras comprenden las bacterias del suelo y el agua que obtienen carbono y nitrogeno de la atmósfera y de la materia inórganica simple, las bacterias heteretrófas requieren compuestos orgánicos más complejos como fuente de carbono y nitrógeno asi como - proteínas o sus derivados, éste último grupo de organismos es él' más importante en bacteriología médica.

Los requerimientos principales para el desarrollo de las bacterias son:

1.- Proteínas: Se suministran generalmente como peptonas que es un producto de diversa composición, preparada por la hidrólisis ácida ó enzimática de la proteína animal ó vegetal, como es el caso del músculo, hígado, sangre, leche, caseína, lactalbumina, gelatina y frijol soya; la composición podrá depender - del material crudo y del método de manufactura, éstas se encuentran en el comercio preparadas.

2.- Factores accesorios de crecimiento: Las vitaminas del complejo B, éstas suministran enzimas necesarias que las bacterias son incapaces de sintetizar, el suero, la yema de huevo.

3.- Sales inorales.- Elementos como el potasio, sodio, calcio, - etc., también son requeridos por algunas bacterias.

4.- Atmósfera.- Algunos microorganismos precisan de una atmósfera con oxígeno, otros son incapaces de reproducirse en presencia de oxígeno libre, en tanto, que los de un tercer grupo - pueden crecer en una atmósfera con oxígeno, logran crecer y - scbrevivir sin él; por lo que las bacterias se clasifican en distintos grupos según la acción que él oxígeno desarrolle - en su crecimiento y metabolismo.

a).- Aerobios obligados .- necesitan oxígeno y les falta la capacidad para realizar fermentaciones; Por ejemplo el bacilo tuberculoso y algunos bacilos esporulados.

b).- Anaerobios Obligados.- Pueden crecer solo en ausencia' de oxígeno, un subgrupo llamado microaerófilo crece mejor en presencia de oxígeno a baja tensión, pero no se desarrolla a la existencia de el aire por ejemplo, el' clostridium.

c).- Organismos Facultativos.- crecen tanto en presencia de oxígeno como en su ausencia, y pasan en presencia de - aire, a un metabolismo de tipo respiratorio; por ejemplo numerosas levaduras y las enterobacterias.

d).- Anaerobios aerotolerantes.- Se trata de organismos parecidos a los facultativos, ya que pueden crecer en -- presencia o en ausencia de oxígeno, pero su metabolismo es siempre de tipo fermentativo; por ejemplo la mayoría de las bacterias acidolácticas.

5.- Presión Osmótica.- Las células pueden encogerse y ser destruidas (plasmólisis) en soluciones hipertónicas; inversamente se rompen (Plasmóptisis) por entrada de agua, en las' soluciones hipotónicas.

6.- Temperatura.- La temperatura en la cuál el microorganismo - bacteriano crece mejor, es considerada como temperatura óptima . Para la mayoría de las bacterias patógenas del hombre es de 37 grados centígrados. El desarrollo bacteriano - tiene lugar entre límites de temperatura cuyos extremos son designados como mínima y máxima, los límites se encuentran' entre 15 y 40 grados centígrados.

Los microorganismos importantes en bacteriología médica son generalmente mesofílicos límites entre 5 y 43 grados centígrados. Sin embargo hay microorganismos que fluctúan entre'

límites de temperatura mucho más bajas; psicrofílicos, ó bién superior; termofílicos. Los primeros son encontrados en el suero y el agua fría, los últimos en la materia orgánica en fermentación.

7.- Luz .- La mayoría de las bacterias se desarrollan mejor en ausencia de luz; la luz de sol, con su componente ultravioleta, puede incluso ser letal.

8.- Reacción.- La mayoría de las bacterias crecen mejor en un medio ligeramente alcalino en un PH de 7.2 a 7.6 , pero existe también un límite de potencialidad bastante amplio. Los hongos crecen con facilidad en medios ácidos PH de 5, mientras que el medio especial para el crecimiento del Vibrio Cholerae debe ser marcadamente alcalino PH de 9.6.

C).- MEDIOS DE CULTIVO PARA UN PROPOSITO

En bacteriología se emplean diferentes tipos de medios, debe - tenerse cuidado de emplear el medio más adecuado para el aislamien to e identificación de las colonias bacterianas.

Los medios pueden ser líquidos o sólidos, La ventaja de éstos - últimos estriba en la facilidad para reconocer los tipos de colo-- nias. Los medios de cultivo pueden ser divididos en cuatro grupos' principales.

1) Medios Simples, líquidos y sólidos
2) Medios Enriquecidos
3) Medios Especiales
4) Medios de Azúcar y bioquímicos diversos

y un quinto grupo que se puede clasificar como medio de enrique cimiento, que son los medios para transporte.

Los medios simples, son medios para el aislamiento primario y - son los que contienen todos los constituyentes esenciales para el' crecimiento. Entre los medios simples se encuentran; El Agua Pepto nada, el Agar nutritivo y el caldo nutritivo; pero los medios de - propósito generalmente más comunes es el Agar, Sangre y el Agar Cho colate; a éstos medios se les considera medios simples-enriqueci-- dos.

Los medios enriquecidos y especiales son medios con componentes que requieren algunos microorganismos. Estos pueden ser tanto se- lectivos como inhibitorios. Son ejemplos de éstos medios; Agar San gre, Medio de loeffler, Agar Sangre y Agar Azida. Agar chocolate - medio de Burdet-Gengou, Medio de Robertson,ect.,

Entre los medios selectivos se encuentran; Agar S.S., Medio de' Sabouraud, Medio de Thyer Martin,Agar EMB,etc.

Los Medios de Azúcar y bioquímicos de rutina más comunes son:' Agar de Kliger,SIM, Surraco,Citrato.

A continuación se describen los medios utilizados en éste ma--- nual; se incluyen los principales medios usados.

MEDIO	TIPO DE ESTUDIO DONDE SE USA	USOS E INTERPRETACION
Agar de Eosina y Azul de me-- tileno (EMB)	Coprocultivo, = Cultivos diver- sos, Cultivo de L.C.R.	El agar EMB sirve para di- ferenciar las colonias de= bacilos entéricos patóge-- nos de los organismos capa ces de fermentar rapidamen te la lactosa, la sacarosa o ambas, las colonias de = Salmonella y Shigella se = diferencian facilmente de= las de Escherichia coli, = por ser de color ámbar o = incoloras, las de Escheri- chia coli son de color == azúl obscuro
Agar S.S.	Coprocultivo	El agar para Salmonella y Shigella puede inocularse con heces, torundas recta- les, orina, u otros mate-- riales que se sospechan == contengan bacilos entéri-- cos. Las colonias que no = fermentan la lactosa son = incoloras, las que fermen- tan y de los coliformes == son de color rojas o rosa- das.
Agar Tergi- tol- 7	Coprocultivo = Cultivos diver- sos, Cultivo de L.C.R.	Para la investigación de = microorganismos coliformes La Escherichia coli produ- ce colonias amarillas, los microorganismos lactosa neg gativa producen colonias = virando el color azul.
Agar para es- filococos # 110	Exudado faringeo	El agar 110 es selectivo pa ra el aislamiento e investi gación de Staphylococcus, = las colonias de Staphyloco- ccus aureus dan colonias == pigmentadas de amarillo do- rado.
Agar verde brillante	Coprocultivo	El agar verde brillante es un medio de Kauffman modifi cado que se usa para el ais lamiento de Salmonella, ex- ceptuando la Salmonella ty- phosa y Salmonella paraty-- phi.

MEDIO	TIPO DE ESTUDIO DONDE SE USA	USOS E INTERPRETACION
		Las colonias típicas de == Salmonella tienen color == rojizo o rosa o casi blanco, las colonias fermentadoras de lactosa producen= color amarillo o verdoso.
Agar Sangre	Cultivos diversos, Urocultivo, == Cultivo de = L.C.R.	La base de agar sangre es= adecuada para aislar y cultivar diversos microorga-- nismos que crecen con dificultad, con la adicion de sangre puede usarse para = descubrir la actividad hemolitíca y para aislar bacilos tuberculosos.
Agar sangre y azida	Urocultivo	La base de agar sangre y = azida es medio selectivo = para aislar Streptococcus= Los microorganismos gram = negativos son inhibidos == por la azida sodica.
Kliger	Prueba bioquímica para la = diferenciación de bacilos -- gram negativos determinándonos la fermentación de glucosa y == lactosa y la == producción de = ácido sulfhídrico y gas.	Las colonias seleccionadas se inoculan en el medio de Kliger en estría en la superficie inclinada y por = punción en la parte profunda. La fermentación de la= glucosa se indica por un = cambio del extremo a un == color amarillo (reacción = ácida del rojo del fenol) La fermentación de la lactosa se indi ca por un === cambio amarillo en la parte inclinada. El ennegrecimiento indica la producción de sulfuros. Y el levantamiento indica la precencia de gas.

MEDIO	TIPO DE ESTUDIO DONDE SE USA	USOS E INTERPRETACION
SIM	Prueba bioquimíca para la diferen-- ciación de los -- bacilos entéricos	El medio de SIM se emplea para la determinacion de pro-- ducción de sulfuros, formación de indol y movilidad de los - bacilos entéricos. La reaccion de sulfuros se indica por el - ennegrecimiento del medio, el' indol da una coloración rosa - al agregarle solucion de Kovac
Urea- Sacarosa (surraco)	Prueba bioquimíca para la diferen-- ciación de los -- bacilos entéricos	En este medio se puede obser-- var la fermentación de la saro sa y la hidrolisis de la úrea' Color morado: hidroliza la -- urea. Color amarillo: Fermenta la sa rosa.
Agar Chocolate	Cultivos diversos Cultivo L.C.R.	Este medio se usa para el cre- cimiento de bacterias de cre-- cimiento dificil, como es el - caso de Haemophilus.
Agar Lowestein- Jensen	Cultivo de BAAR	Este medio se usa para el aislamiento de bacilos ácido-alcó hol resistentes en diversas -- muestras.
Agar Mycosel	Para la selección de hongos de diversas muestras.	El agar Mycosel es medio com-- pleto con antibióticos que facilitan el aislamiento de los' hongos patógenos a partir de - materiales con gran flora u -- hongos y bacterias. Los hongos dermatófitos y la mayor parte' de los causantes de micosis -- sistémicas crecen rapidamente' en tanto que la mayor parte de los hongos saprófitos y las -- bacterias son casi inhibidos - por completo.
Infusion de cerebro corazón.	Medio líquido de - enrequicimiento para el transporte - de muestras y toma de exudado y copros	La infusión de cerebro corazón es medio liquido para el cul- tivo de bacterias, de cultivos diversos.

Los anteriores medios pueden obtenerse comercialmente en forma deshidratada y se preparan de acuerdo con su instructivo.

III.- M A T E R I A L Y M E T O D O S

COPROCULTIVO

INTRODUCCION: La flora bacteriana del intestino es === abundante y variada, mediante el estudio bacteriológico pue de determinarse la etiología del 40 por ciento de las dia-- rréas; los gérmenes que se investigan de ordinario con Sal- monella, Shigella y en niños menores de 10 años, cepas patógenas de Escherichia coli; entre los microorganismos que == normalmente habitan en el tracto intestinal, estan la Kleb- siella, Enterobacter, Proteus, Pseudomonas, ocasionalmente= es importante investigar Staphylococcus aureus y Candida == albicans en personas con diarrea intensa, dibilitadas por = otros padecimientos y con antecedentes de haber recibido == tratamiento con antimicrobianos de amplio espectro.

SUSTANCIAS Y REACTIVOS:

Eosina azul de metileno agar EMB
SS agar
Tetrationato ó selenito caldo
Agar verde brillante
Kliger agar
SIM agar
Urea Sacarosa (Surraco) caldo
Antisueros para identificar Salmonella, Shigella y cepas patógenas de Escherichia coli .
Solución de lugol.

METODO:

Material biológico: La muestra de elección es la mue- tra fecal recientemente evacuada; siempre que sea posible = es importante colectarla antes de iniciar la terapéutica == antimicrobiana; de la muestra se selecciona preferentemente para la siembra: moco, sangre y fragmentos de epitelio.

Las muestras tomadas de la mucosa rectal mediante hi- sopo depositado en tubo con 2 ml. de caldo nutritivo BHI se emplea ordinariamente en niños menores de cinco años; y son las indicadas en enfermos con cuadro agudo de diarrea o di- sentería, en pacientes hospitalizados.

La muestra debe sembrarse inmediatamente en los medios adecuados antes de que transcurran dos horas de su evacuación, cuando se demora, se coloca un gramo aproximadamente de materia fecal en el medio de Stuart.

Cultivo: Una asada de muestra o el hisopo con que se tomo se inoculan directamente en los medios de EMB, SS; además el hisopo con que se tomo la muestra se deja en el tubo con el caldo nutritivo y se añade 3 ml. aproximadamente de caldo de tetrationato y 0.2 ml. de la solución de lugol. Estos medios se incuban a 37 grados centígrados durante 24 horas.

El cultivo en el medio de tetrationato se resiembra en el medio de agar verde brillante y se incuba a la temperatura de 37° C. durante 24 horas. Se procede a la lectura de los cultivos en los medios de EMB y SS.

Interpretación de los cultivos: Escherichia coli se diferencia de otras enterobacterias por que fermenta rápidamente la lactosa, sus colonias se colorean en el medio de EMB de un color azul negro con brillo metálico, en el medio SS tienen un color rojo. Se seleccionan diez colonias de Escherichia coli y se siembran en el medio de tripticasa soya agar se incuba 37° C. durante 24 horas para obtener cultivos puros para identificarlas serologicamente con los antisueros.

Las colonias de Salmonella y Shigella son incoloras en los medios de EMB y SS, en el medio de verde brillante son de color rosa, opacas y rodeadas de una zona de color rojo brillante. Las colonias que tienen las caracteristicas anteriores deben ser sembradas en los medios de kliger, sim, urea sacarosa para estudiar sus reacciones bioquímicas.

Interpretación de las reacciones bioquimicas:

Kliger: En este medio se observa las fermentaciones de la glucosa, lactosa y la producción del sulfuro de hidrógeno y gas. Se siembra por picadura y estrías en su superficie, se incuba 24 horas a 37° C.

Lectura: Fondo amarillo: fermenta la glucosa

Superficie amarilla: fermenta la lactosa.

Lectura: Trayecto de la picadura negro: Produce ácido sulfhídrico..

Formación de burbujas en el medio y elevación del mismo: Producción de gas

SIM: En éste medio se puede observar la producción de ácido sulfhídrico, indol y la movilidad del gérmen. Se siembra por picadura y se incuba 24 horas a 37 grados centígrados.

Lectura: Trayecto de la picadura negro: Produce ácido Sulfhídrico.

Cuándo se añade el rectivo de Kovac y da color rojo: Indica producción de indol

Cuándo el gérmen se desarrolla en el trayecto de la picadura y se extiende a los lador: Es movil

Uréa Sacarosa: En este medio se puede onservar la fermentación de la sacarosa y la hidrólisis de la uréa.

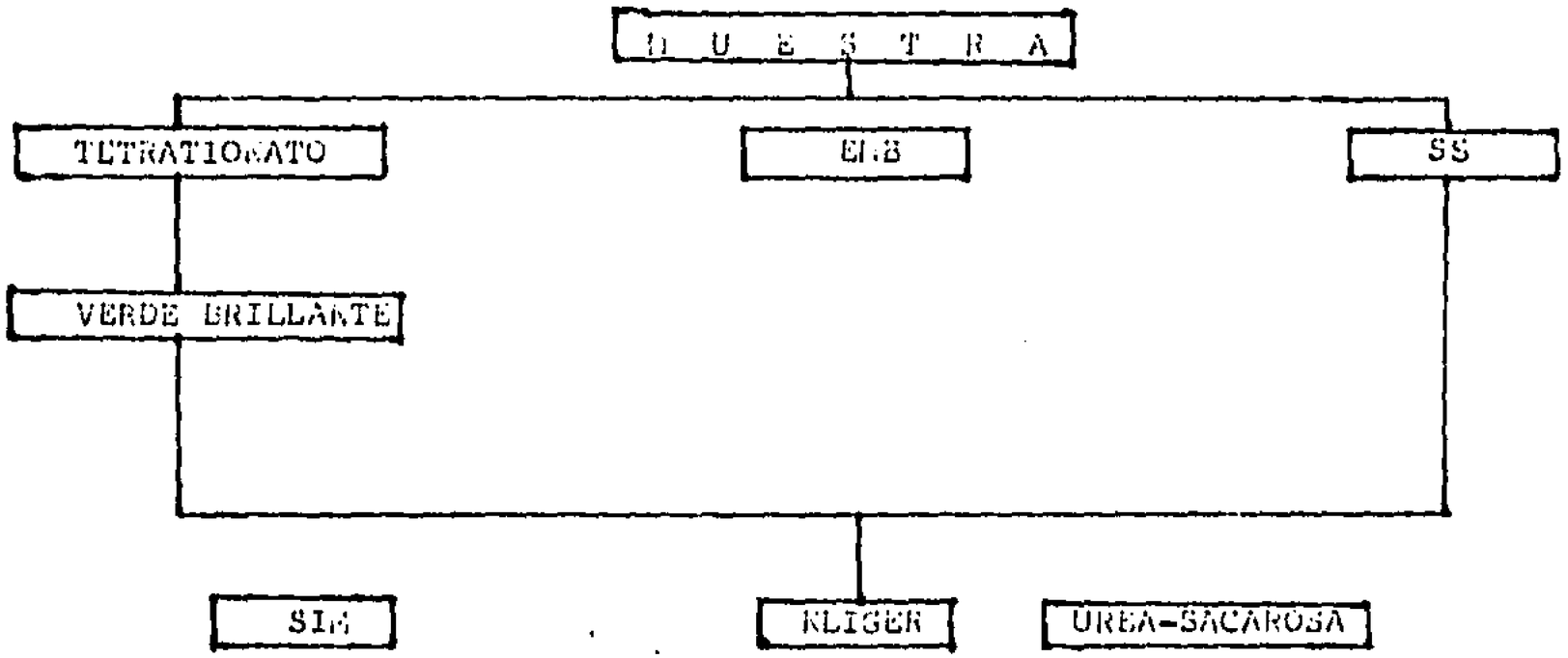
Lectura: Color Morado: Hidroliza la uréa

Color Amarillo: Fermenta la Sacarosa

Cuándo los resultados de la qioquimica corresponden a gérmenes de los generos de Salmonella y Shigella se procede a la identificación serológica con los antisueros correspondientes

Flora Normal: Generalmente se encuentran: Escgerichia coli, Proteus, Klebsiella, citrobacter, Bacteroides, Enterobacter, Pseudomonas, Staphylococcus, Levaduras.

C U A D R O # 1 C O P R O C U L T I V O



IDENTIFICACION SEROLOGICA

NOTA: 1.- De las colonias de Escherichia coli desarrolladas en el medio de EMB se toman de 8 a 10 colonias y se siembran en agar triptocasa soya para obtener un cultivo puro para su identificacion con los -- antisueros correspondientes.

2.- También se puede utilizar los siguientes medios - bioquímicos TSI en vez de KLIGER y la UREASA en - vez de UREA-SACAROSA.

CUADRO 2 BIOQUIMICA DE MICROORGANISMOS CON MAYOR FRECUENCIA SE AISLAN DE LAS MATERIAS FECALES.

	Lactosa	Glucosa	Sacarosa	Urea	Movilidad	H2S	Gas	Indol
Escherichia coli	+	+	+ o -	-	+ o -	-	+	+ (-)
Salmonella	-	+	-	-	+	+ &	+	-
Shigella dysenteria	-	+	-	-	-	-	-	v
Shigella flexneri	-	+	-	-	-	-	-	v
Shigella boydii	-	+	-	-	-	-	-	v
Shigella sonnei	- o + lento	+	- o + lento	-	-	-	-	-
Proteus mirabilis	-	+	v	+	+	+	+	-
Proteus vulgaris	-	+	+	+	+	+	+	+
Morganella morganii	-	+	- (+)	+	+ (-)	-	+	v
Klebsiella	+	+	+	+ o -	-	-	+	-
Pseudomonas	-	+	-	+ o -	(-)	-	-	-
Citrobacter	+	+	+ o -	- o + lento	+	+	+	-
Enterobacter	+ o -	+	+	- o + lento	+ o -	-	+	v

v= variable

& Hay excepciones como: Salmonella typhi, Salmonella paratyphi A y C producen escasa o ninguna cantidad de H2S.

UROCULTIVO

INTRODUCCION: El diagnóstico de las infecciones de las= vias urinarias se hace demostrando bacteriuria por medio del cultivo. El urocultivo cuantitativo permite distinguir la == bacteriuria significativa de la simple contaminación de la = muestra.

SUSTANCIAS Y REACTIVOS:

Agar sangre

Agar sangre-azida

B.H.I.

Asas calibradas de 4 mm.de diámetro da .01 ml.,de 1.5 mm de diametro da .001 ml.

Material y aparatos comunes en un laboratorio

METODO:

Material biológico: La muestra es la orina obtenida a= partir de bolsas de plástico adhesivas, colocadas en los ni= ños previamente aseados sus órganos genitales. En niños mayo res se dan instrucciones para que se lave con agua y jabon = sus órganos genitales externos y se presente en el laborato= rio sin haber orinado al levantarse. En el laboratorio nueva mente se asean los organos genitales externos y en seguida = se aplica en la región que rodea al meato urinario una solu= ción de merthiolate o de cloruro de benzalkonio. Una vez que empieza la micción, se desecha la primera orina que arrastra rá los Organismos contaminantes.

El urocultivo debe hacerse dentro de la hora siguiente a la= recolección de la orina, o bien si esto no es posible debe = guardarse la orina en el refrigerador a 4 grados hasta que = pueda cultivarse.

Cultivo: El método cuantitativo que se utiliza de ru-- tina es el de la asa calibrada, se usa una asa calibrada pa= ra inocular 0.01 ml. de orina, esta asa es de 4mm. de diáme= tro y una asa de 1.5 mm. de diametro con una capacidad de == 0.001 ml. de orina. Se toma una asada de la orina y se hace= una siembra por estrías en la mitad de la placa con la asa = de 4 mm. y en la otra mitad de la placa con la asa de 1.5 mm

los medios que se utilizan son agar sangre, EMB y agar sangre azida en el agar sangre se desarrollan todos los microorganismos presentes en la orina, en el agar sangre azida es medio selectivo para -- aislar Streptococcus y son inhibidos los microorganismos gramnegativos, en el EMB se desarrollan solamente microorganismos gramnegativos.

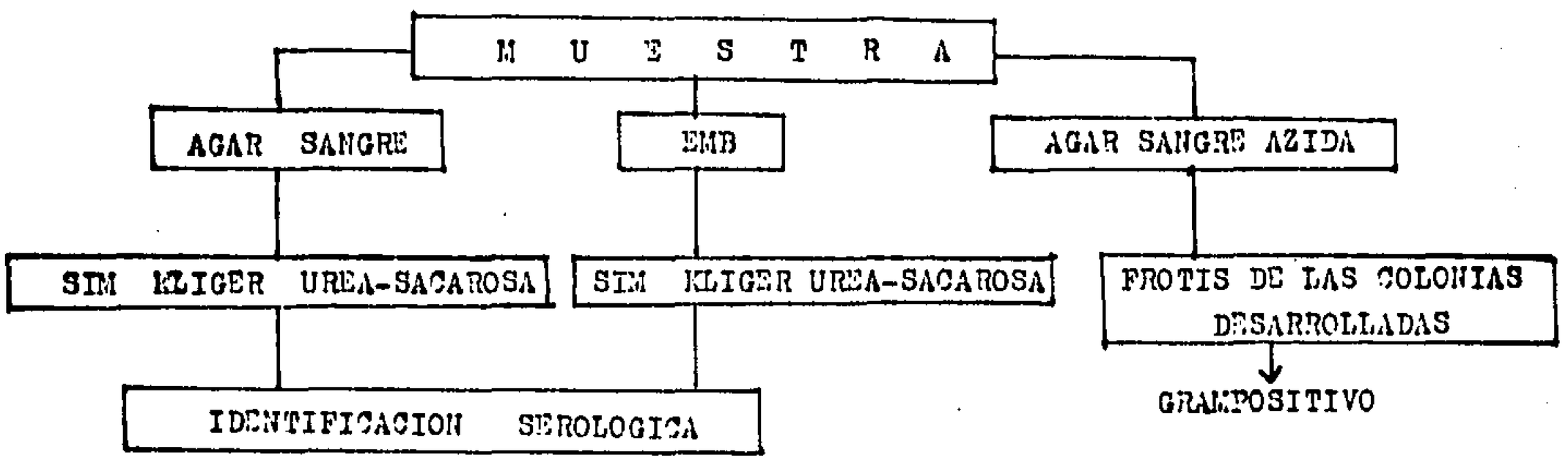
Interpretacion de los cultivos, se consideran positivos los -- cultivos que desarrollan más de 10,000 colonias, los cultivos positivos en agar sangre y EMB se les practica las reacciones bioquímicas siguientes; Kliger, SIM, Urea-Sacarosa, a todas las colonias -- diferentes, los cultivos positivos en agar sangre azida se les realiza frotis y se identifican como grampositivos, realizandose posteriormente la identificación de los gramositivos.

Flora microbiana en la orina: Aúnque no es posible tabular sin calificar, los microorganismos hallados en la orina "normal" en oposición a los de la orina "infectada", las listas siguientes se basan sobre la frecuencia de ocurrencia.

GRAM POSITIVA	PATOGENA	NO PATOGENA
	Staphylococcus aureus	Staphylococcus
	Streptococcus pyogenes	epidermides
	Candida albicans	Bacillus subtilis
		Bacillus difteroides
		Levaduras saprófitas
GRAM NEGATIVA	Escherichia coli	
	Aerobacter	
	Proteus	
	Salmonella	
	Shigella	
	Neisseria	

En personas normales, generalmente no hay desarrollo de gérmenes o tienen menos de 10,000 en 1 ml. sin aumento de leucocitos en orina

C U A D R O # 3 U R O C U L T I V O



Streptococcus: DIFERENCIACION: TAXO A
TAXO P

H E M O C U L T I V O

INTRODUCCION: En los hemocultivos pueden encontrarse gran variedad de agentes infecciosos los cuáles producen septicemia o -- bacteriemia. El hallazgo de éstos agentes por hemocultivo proporcio na un dato importante de los padecimientos infecciosos. La muestra' debe tomarse antes de iniciar todo tratamiento con antimicrobianos' en el período febril y lo más cerca posible del principio clínico - de la enfermedad, ya de ahí en adelante la frecuencia de positivi-- dad desciende porgresivamente en el curso de la infección.

SUSTANCIAS Y REACTIVOS:

Medio para hemocultivo, Dr. Ruiz Castañeda o él disponible comercialmente
Agujas y jeringas de 20 ml. estériles
Agar EMB
Agar Sangre
Kliger
SIM
Surraco
Antisueros para identificar, Salmonella, Shigella y cepas' de Escherichia Coli.

METODO:

Material Biológico: 10 ml. de Sangre venosa.

Cultivo: El tapón de caucho del frasco del medio de elección' se flámea con alcóhol para destruir los microorganismos contaminantes, se cubre el tapón con una torunda mojada en alcohol. Con una - técnica cuidadosa y con una asepsia total se recogen en una jeringa estéril entre 5 y 10 ml. de sangre. La aguja de la jeringa se introduce a tráves del tapón de caucho y la sangre se expulsa en el medio y se mezcla. El frasco debe rotularse con:

Nombre del paciente, fecha, sala.

Incubar la botella con el contenido a 37 grados en posición vertical,observarlas diariamente y volverlas a incubar.

Cuándo haya desarrollo haga frotis según el resultado prosiga la identificación; si es un gramnegativo se procede ha hacer' reacciones bioquímicas, se resiembra en EMB y Agar Sangre, si hubo desarrollo en Agar Sangre se realiza un frotis; si es -- gramnegativo se procede a la identificación serológica de Bru selas; si es Grampositivo se hace la prueba de coagulasa,si - fué un Staphylococcus se le hace el TXA y el TXP para la dife renciación del Streptococcus alfa hemolítico y él Streptoco-- ccus pneumoniae.

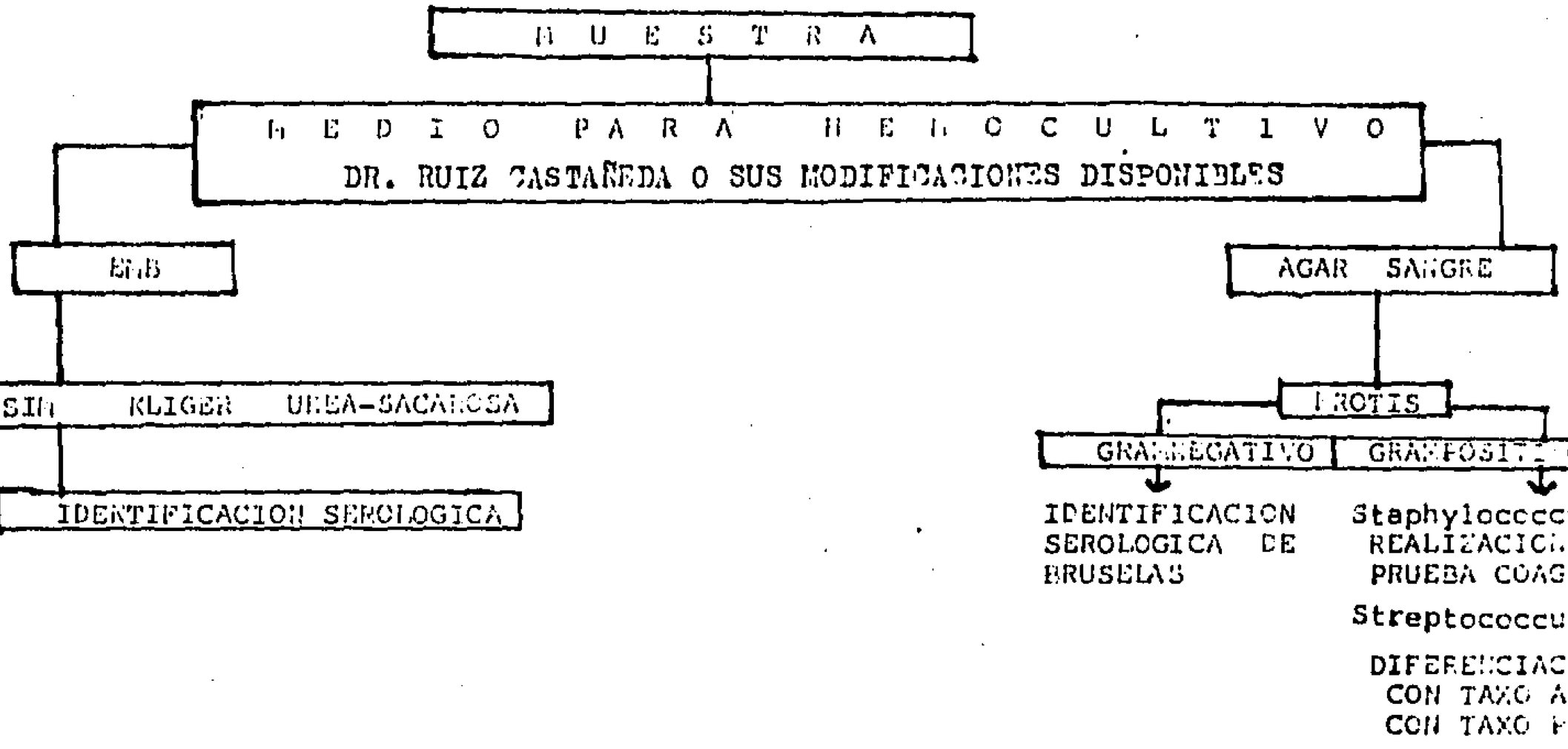
Los hemocultivos no se deben desechar hasta después de 30 --- días de incubación y deben examinarse cada 24 hrs.

VALORES NORMALES: Negativo.

PRINCIPALES MICROORGANISMOS QUE PUEDEN ENCONTRARSE EN LOS --- H E M O C U L T . V O S:

Streptococcus Viridians
Stretococcus pyogenes
Staphilococcus aureus
Diplococcus pneumoniae
Neisseria meningitidis
Brucella sp.
Proteus sp.
Enterococcus
Pseudomonas aeroginosa
Streptococcus Anaerobios
Salmonella sp.
Leptospira sp.
Streptobacillus moniliformis
Echerichia coli
Citrobacter
Klebsiella

C U D R O # 4 H E M O C U L T I V O



NOTA: 1.- Los hemocultivos principalmente en casos de brucelosis, deben examinarse cada 24 horas y no se deben desechar hasta despues de 30 dias de incubación, antes de eliminar los cultivos.
2.- También se pueden utilizar los siguientes medios bioquimicos: TSI en vez de KLIGER y la UREASA en vez de UREA-SACAROSA.

EXUDADO FARINGEO Y NASAL

INTRODUCCION: Los cultivos de faringe y nasofaringe son - importantes en el diagnóstico de ciertas enfermedades. El procedi-- miento debe proyectarse para descubrir practicamente todos los probables organismos patogénicos asociados habitualmente con las infecciones del tracto respiratorio superior. En éste grupo se encuen--- tran Corynebacterium Diphtheriae, Streptococcus del grupo A beta hemolítico y otros estreptococcus, Listeria, las especies Haemophylus Staphylococcus aureus.

Siempre que sea posible, deben obtenerse los especímenes antes de - la administración de la terapéutica antimicrobiana.

MATERIAL: SUSTANCIAS Y REACTIVOS,

Hisopos de algodón estéril
Caldo BHI
AGAR sangre de carnero
Otros medios según necesidades: Agar sangre Chocolate, Bordet--Gengou, Sabouraud, étc.
Material y aparatos comúnmente empleados en el laboratorio de microbiología.

METODO:

Material Biológico: Los cultivos de la garganta pueden recogerse fácilmente mediante aplicadores con punta de algodón o fibra de poliéster.

Debe oprimirse la lengua para que la gargante quedé adecuadamente' expuesta e iluminada. Debe frotarse la torunda sobre cada área tonsilar y sobre la faringe posterior. También debe frotarse cual---- quier zona que muestre exudado. Hay que tener cuidado de evitar el rozamiento con la lengua y los labios para evitar la contaminación de la torunda. Cuándo sea posible, las placas de cultivo deben ser inoculadas.

Cultivo: Después de que se tomó, la muestra el hisopo se hace rodar y se frota en el borde de una placa de agar sangre cubriendo sólo un sexto de la superficie, se estría la placa; al final el asa se hunde varias veces en el medio para investigar hemólisis bajo la superficie. Se incuba la placa a la temperatura de 37 grados durante 24 horas.

Identificación de los cultivos:

Streptococcus beta hemolítico. Las colonias de la superficie del Agar Sangre son pequeñas, de menos de 1 mm. de diámetro, convexas, traslúcidas, grisáceas, opacas, duras, y secas, rodeadas por una zona de hemólisis de 2 mm. de diámetro, se observa perfectamente transparente e incolora, sin eritrocitos o muy escasos; las colonias abajo de la superficie son de forma lenticular y están rodeadas también por una zona de hemólisis sin eritrocitos.

Streptococcus grupo A, se hace un frotis de las colonias descritas anteriormente, se le hace un gram. Si se observan cocos en cadena se toman colonias, se siembran en Agar Sangre, en su superficie se coloca un disco Taxo A, se incuba 24 Hrs. a 37 grados, si se observa una zona de inhibición del desarrollo de 15 a 20 mm. de diámetro cuadrado, el Streptococcus es del grupo A sino se reporta como Streptococcus no del grupo A.

Streptococcus alfa hemolítico. Las colonias están rodeadas inmediatamente por una zona, que puede ser estrecha eritrocitos intactos pero decolorados, de color verde o café verdoso por la degradación de la hemoglobina beta biliverdina; después de ésta zona de decoloración se puede observar una zona más clara de hemólisis. Las colonias suelen confundirse con las de neumococcus y para diferenciarlas se utiliza la cualidad que tienen éstas últimasde ser inhibidas por el disco Taxo P, antes de hacer ésta prueba se debe de hacer un frotis teñido de Gram, ya que la morfología de los neumococcus es muy típica.

Neumococcus: La morfología de los Neumococcus, son cocos de forma lanceolada dispuestos en pares o cadenas cortas. Pueden confundirse con el Streptococcus alfa hemolítico, para diferenciarlos se usa el disco Taxo P que produce inhibición a las colonias de neumococcus.

Staphylococcus Aureus: En Agar Sangre se desarrolla colonias grandes, aperladas, opacas y generalmente producen hemólisis beta. algunas veces las colonias de éste gérmen pueden confundirse con las del Streptococcus beta hemolítico.

La diferenciación puede hacerse mediante el frotis teñido al Gram o con la prueba de la catalasa. En el frotis se observan las colonias de Staphylococcus como coco gram positivos en racimo de uva.

Los Staphylococcus se pasan sembrandose en el medio 110 para -- Staphylococcus , se incuban a 37 grados por 24 hrs., los Staphylococcus coagulasa positiva se observan de color dorado, los que se observen de color blanco se le hace la prueba de la coagulasa en - placa.

Neumococcus , las colonias en Agar Sangre son brillantes transparentes y con una zona de alfa hemólisis. Pueden confundirse con él Streptococcus alfa hemolítico, para diferenciarse se hace frotis,observándose la morfología como cocos de forma lanceolada dispuestos en pares o cadenas cortas; y se le hace la prueba del Taxo P.

Bacilo Diftérico: Son bacilos grampositivos,rectos o ligeramente encorvados que se presentan en empalizada o semejantes a las letras chinas; no se tiñen uniformemente, sino que presentan gránulos metacromáticos.

Cándida Albicans: Sólo es importante cuándo se observan numerosas espóras y micelios en el frotis. En el Agar Sangre, las colonias se asemejan a las bacterianas son lisas y cremosas; en la superficie del Agar Sangre crece como levaduras gemantes ovales.

Bordetella Pertussis: Se investiga de preferencia en la muestra de nasofaringe, siempre y cuándo el médico lo pida. La muestra se siembra en Agar Sangre-Glicerol-Papa o medio de Bordet-Gengou por lo tanto el laboratorio debe ser notificado con anticipación, a -- fin de permitir la preparación de dicho medio. A las 72 hrs. las - colonias que aparecen en las placas de Bordet-Gengou presentan una superficie convexa, lisa y transparente, con brillo nacarado. Su - aspecto es similar al de las gotas de mercurio. Se puede observar' una estrecha zona de hemólisis alrededor de las colonias. En la -- tinción de Gram, las células bacterianas aparecen como bastonci--- llos cocoides gramnegativos en forma bipolar.

Bacilos coliformes: La abundancia de su desarrollo se puede valorar en Agar Sangre; lo importante es que las colonias predominen claramente sobre todas las otras.

Meningococcocos Se siembra la muestra nasofaringe en medio de Agar Sangre, en medio de Thayer martin como para investigar gonococo' se identifica mediante la fermentación de los azúcares y la prueba de oxidasa y serológico de aglutinación en lámina.

INFORME DEL RESULTADO: A los tres días debe informarse el resultado, informándose la proporción de colonias aisladas ya sea como, abundantes, moderadas o escasas.

VALORES NORMALES:

MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN LA FARINGE DE PERSONAS SANAS:

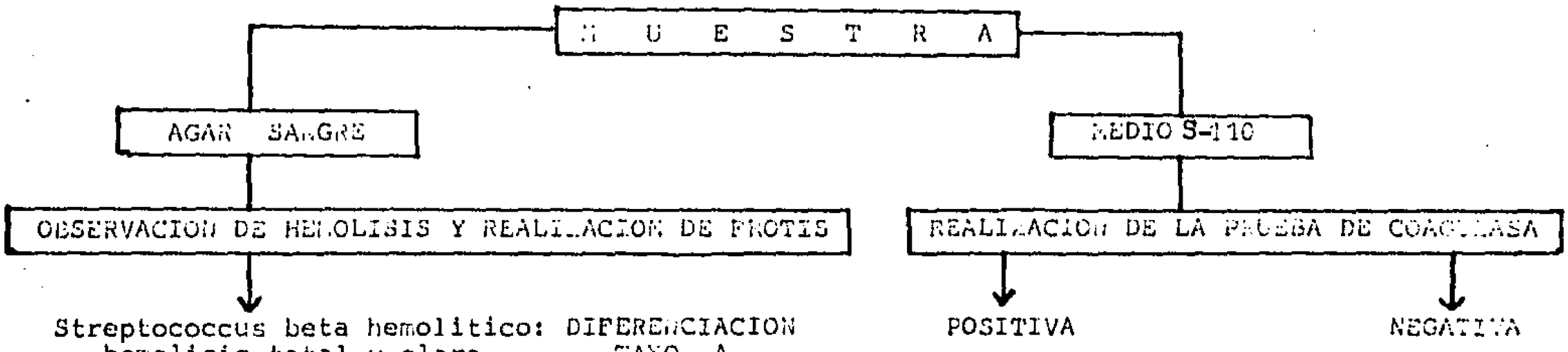
Streptococcus beta hemolítico (no del grupo A)	Streptococcus Alfa hemolítico
Streptococcus gama hemolítico	Neisserias catarrhalis y otras Neisserias.
Staphylococcus coagulasa neg.	Staphylococcus Coagulasa Pos.
Haemophylus haemolyticus	Haemophylus influenzas
Neumococococo	bacilo Difteroides
Bacilos Coliformes (después de tratamiento con penicilina).	Cándida albicanas.

MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN PERSONAS EN PROCESO INFLAMATORIA DE LA FARINGE:

Staphylococcus aureus	Bacilos coliformes
Bordetella pertussús	Cándida albicans
Haemophylus influenzae	
Meningoccc occo(portadores)	
Corynebacterium Diptheriae	

La importancia de éstos microorganismos ésta relacionada con la abundancia de ellos en el exudado.

C U A D R O # 5 E X U D A D O F A R I N G E O Y N A S A L



NOTA: 1.- En vez de TAXO P se puede realizar la prueba de solubilidad en bilis para diferenciar especificamente entre el Streptococcus pneumoniae - soluble en bilis y otras especies de streptococcus alfa-hemoliticos' no solubles en bilis.
2.- En vez de TAXO A: bacitracina.
3.- En vez de la prueba de la coagulasa la prueba de licuefacción de la' gelatina.
4.- En vez del medio S-110 se puede utilizar el medio de Champman.

CLINICA DEL LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

INTRODUCCION: La meningitis es una infección inflamatoria que - afecta a las meninges del cerebro, a la médula espinal, asi cómo -- los espacios subaracnoideos; algunas veces se presenta cómo enferme dad primaria y otras veces consecutivamente a una infección de algu na otra parte del cuerpo.

El estudio bacteriológico del líquido cefalorraquídeo es esen--- cial en el diágnostico de la meningitis de etiología infecciosa. A- proximadamente el 50 % de los microorganismos aislados en éstas in- fecciones en nuestro medio corresponden a Mycobacterium tuberculo-- sis el 20 % a Haemophilus (principalmente en niños) el 15 % a ente- robacterias y el resto a gérmenes cómo Streptococcus grupo A, Stha- phylococcus Aureus, Neisseria meningitidis, Pseudomonas, bacteroides hongos y virus.

En la reningitidis bacteriana el líquido es frecuentemente puru- lento, el número de células por mm2. es generalmente mayor de ---- 1,000 con predominio de polimorfonucleares y la concentración de - glucosa está disminuída. En la meningitis causadas por Mycobacte--- rium tuberculosis; virus hongos y protozoarios; el líquido no suele ser purulento, células mononucleares y ocasionalmente leucocitos po- limorfonucleares y la concentración de la glucosa es normal, o lige ramente disminuída.

Los microorganismos que seencuentran con más frecuencua en la me ningitis son los siguientes:

Neisseria meningitidis	Diplococcus pneumoniae
Haemophilus sp	Staphylococcus aureus
Escherichia coli	Listeria monocytogenes
Bacteroides sp	Virus
Streptococcus pyogenes	Mycobacterium tuberculosis
Cryptococcus neoformans	Pseudomonas aeruginosa
Proteus sp.	Mima polymorfa
Hongos.	

MATERIAL Y EQUIPO:

Medios de cultivo:

Agar Sangre
Agar Chocolate
Agar Tergitol 7 o EMB
Equipo para obtener el LCR
Material y aparatos comunes en el laboratorio de microbiología.

METODO:

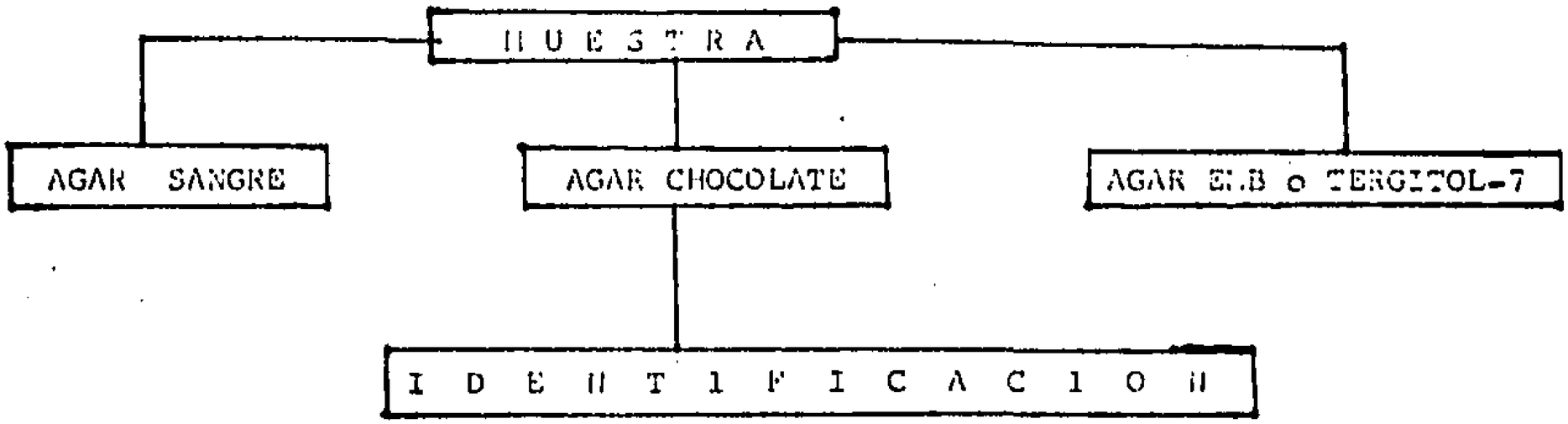
Material Biológico: El líquido cefalorraquídeo debe ser colectado por el médico bajo condiciones de esterilidad llevado inmediatamente al laboratorio. No se deben de refrigerar las muestras para someterlas a exámen posterior.

Cultivo: se siembra en los siguientes medios, Agar Sangre - Agar chocolate, Agar Tergitol 7 o EMB, los medios de Sabouraud y Lowenstein jensen , bajo la sospecha clínica de hongos'

La identificación final de los gérmenes aislados se hace de acuerdo a cada uno, usando los métodos bioquímicos o serológico adecuados al caso.

VALORES NORMALES: El líquido cefalorraquídeo normal es estéril.

CUADRO # 3 CULTIVO DE LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO



NOTA: 1.- La identificación final de los germenes aislados se hace de acuerdo a cada uno, usando los metodos biquimicos o serologicos adecuados - al caso.

2.- Los medios de Sabouraud dextrosa y Lowenstein Jensen se usarán bajo la correspondiente sospecha clínica o según los resultados del estudio citoquímico.

CULTIVO DE DIVERSAS SECRECCIONES

INTRODUCCION: Las diversas secrecciones que estudiaremos en este capitulo son: cultivo de exudado vaginal, cultivo ocular, cultico de exudado uretral, estudio bacteriológico de secreciones de heridas. Como sabemos la flora microbiana de los diferentes exudados es diversa por lo que solamente se daran lineamientos generales aparte de mencionar los valores normales o flora normal de cada secrección o exudado, tambien se mencionará los microorganismos más frecuentes aislados.

MATERIAL Y EQUIPO:

Medios de Cultivo: Los medios de cultivo rutinarios son:

Agar Sangre
Agar Chocolate
Tergitol o Agar EMB

METODO:

Material Biológico: La muestra para cultivo debe ser material del verdadero sitio de infección y debe recogerse con un mínimo de contaminación de tejidos,órganos o secreciones adyacentes.

Cultivo: El material obtenido se siembra en agar sangre,Agar chocolate,Tergitol o EMB

VALORES NORMALES PARA SECRECION VAGINAL:

FLORA PATOGENA	FLORA NO PATOGENA
Neisseria gonorrhoeae	Neisseria catarrhalis
Haemophilus vaginalis	Neisseria flava
Haemophilus ducreyi	Bacilos coliformes
Staphylococcus aureus	Lactobacilus acidophylus
Streptococcus Beta hemolítico	Bacillus subtilis
Cándida albicans	Difteroides
Trichomona vaginalis	Streptococcus no hemolítico
Mycobacterium tuberculosis	Enterococcus
	Staphylococcus no hemolítico
	Levaduras saprófitas
	Mycobacterium smegmatis

VALORES NORMALES SECRECION OTICA

Flora no patógena constituída principalmente por:

Staphylococcus coagulasa negativa
Difteroides
Gaffkya tetregena
Bacillus

VALORES NORMALES SECRECION OCULAR:

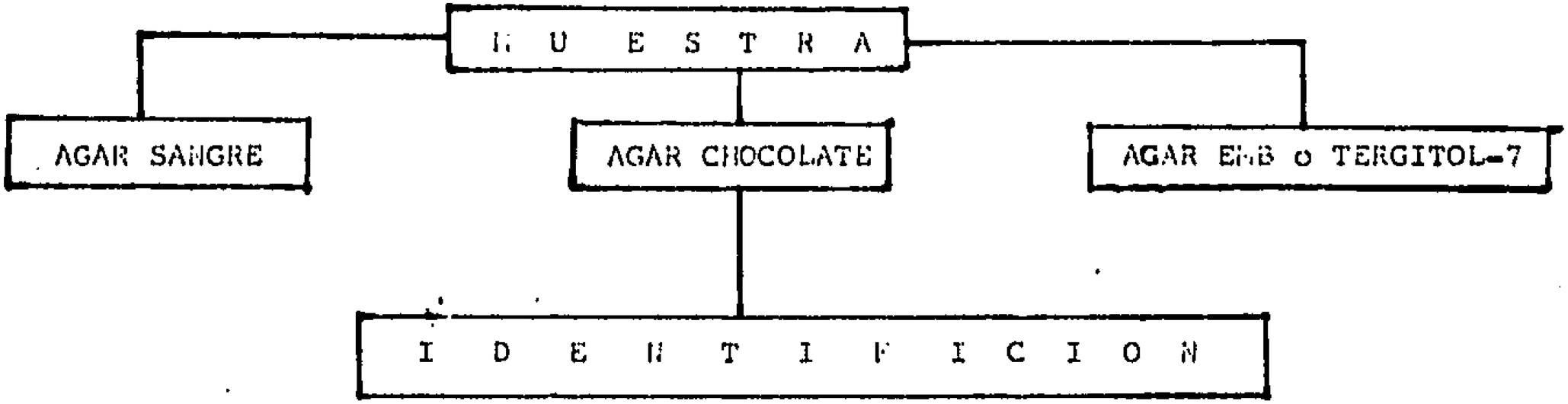
Flora no patógena constituída principalmente por:

Staphylococcus y Difteroides

VALORES NORMALES DE SECRECIONES DE HERIDA:

No existe valores de referencia definidos tanto la negatividad del resultado como el papel patógeno que pudieren desempeñar en el proceso los gérmnes aislados deben valorarse desde un punto de vista clínico bacteriológico.

CUADRO # 7 SECRECIONES Y EXUDADOS DIVERSOS



NOTA: 1.- La identificación final de los germenes aislados se hace de acuerdo a cada uno, usando los metodos bioquimicos o serologicos adecuados' al caso.

P A R A S I T O L O G I A:

INTRODUCCION: Debido a que el tamaño relativamente grande de muchos de los animales parásitos más comunes los hace visibles; al ojo del hombre antiguo conocía sin duda algo de su estructura y de las enfermedades que pueden causar. Los parásitos tales como Ascaris (lombrices), enterobios (gusanos) y Tenias fueron conocidos - en los antiguos Egipto, Grecia y Roma.

La Parasitología comenzó a desarrollarse como ciencia hacia - mediados del siglo XIX. Al promediar el siglo XVII, Redi, que fué llamado padre de la parasitología, escribió el primer texto ilustrado en 1699. A fines del siglo XVIII Gotz, escribió el más amplio texto sobre parásitos.

En la década de 1860, se establecieron claramente los ciclos vitales de muchos de los parásitos, habiendo los parásitologos de la época rastreado varios parásitos a través de sus fases adulto - huevo, huésped y nuevamente adulto, esencialmente al dejar de lado la cuestión sobre la generación espontánea, Hacia la mitad del siglo XIX se escribieron muchos textos excelentes y se dejó bién establecida la naturaleza de muchos parásitos humanos.

Los conocimientos básicos sobre parasitología no han avanzado significativamente en el siglo XX. Los ciclos vitales de virtualmente todas las enfermedades parasitarias del hombre han sido bién establecidas y la mayoría de los países desarrollados del mundo se han puesto en efecto medidas preventivas.

CICLOS VITALES DE LOS PARASITOS DE IMPORTANCIA PARA EL HOMBRE:

Los microbiólogos deben por lo menos conocer lo suficiente acerca de los diversos ciclos vitales, como para reconocer las formas infectivas y diagnósticas de aquellos parásitos que comúnmente causan enfermedades humanas, y saber algo sobre los huéspedes intermedios que pueden jugar un papel significativo.

Los parásitos pueden dividirse en tres grupos importantes en base a sus ciclos vitales:

1) Los que no poseen huésped intermedio
2) Los que poseen un huésped intermedio
3) Los que requieren dos huéspedes intermedios

ESQUEMA DE LOS CICLOS VITALES DE PARASITOS DE IMPORTANCIA PARA EL HOMBRE:

ESQUEMA 1 NO HAY HUESPED INTERMEDIARIO	
Hombre a Hombre	
Enterobius vermicularis	Balantidium coli
Trichuris Trichuria	Giardia lamblia
Ascaris lumbricoides	Chilomastix mesnili
Anquilostomas	Trichomonas hominis
Strongyloides stercoralis	
Hymenolepis nana	
Entamoeba histolytica y otras amebas	

ESQUEMA 2 UN HUESPED INTERMEDIARIO	
Hombre	Hombre
Cerdo	Taenia solium Trichinella spirallis
Vaca	Taenia saginata
Perro	Echinococcus granolosus
Vinchuca	Dipylidium canunum
	Hymenolepis diminuta
Pulga	Trypanosoma cruzi
Mosquito	Plasmodium sp Wuchereria bancrofti Brugia malayi
Caracol	Schistosoma sp
Copépodo	Dracunculus medinensis
Mosca	Tábanos: Leishmania sp. Tse-tse: Trypanosoma sp Chrysops: Loa loa Simulium: Onchocerca volvulus

ESQUEMA 3 DOS HUESPEDES INTERMEDIARIOS

Paragonimus westermani

Hombre - Huevo - Miracidio - Cercaria - Crustaceo- Hombre

Diphyllobothrium

Hombre - Huevo - Miracidio - Cíclope - Pez - Hombre

Clonorchis Sinensis

Hombre - Huevo - Miracidio - Caracol - Cercaria-Pez-Hombre

Fasciola Spp

Hombre - Huevo - Miracidio - Caracol - Planta - Hombre

DEFINICION Y CLASIFICACION DE LAS TECNICAS PARASITOSCOPICAS MAS USUALES EN EL DIAGNOSTICO DE PARASITOSIS INTESTINALES:

EXAMEN PARASITOSCOPICO: Estudio técnico de laboratorio, de - productos biológicos (sangre,secreciones y excreciones corporales,tejidos,etc.,) para la detección e identificación de parásitos.

EXAMEN COPROPARASITOSCOPICO: Estudio técnico de laboratorio' de materia fecal para la detección e identificación de parási-- tos.

CLASIFICACION DE EXAMENES COPROPARASITOSCOPICOS:

1.- Método directo en fresco.
2.- Método de concentración por centrifugación flotación (faust).
3.- Método de concentración por sedimentación (Ritche)
4.- Método de concentración por flotación (Willis)
5.- Método para concentración de larvas rabditoides y filariformes (Baermann).
6.- Método de dilución (stoll)
7.- Método de concentración por centrifugación flotación (ferreira)
8.- Técnica del extendido grueso y celófan . (técnica de Kato)
9.- Tamizado
10.- Método de Graham (raspado perianal)

CONSIDERACIONES GENERALES PARA LA OBTENCION Y MANEJO DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL:

TOMA DE LA MUESTRA: Salvo el caso de niños, en los que se recomienda utilizar cucharilla rectal, la toma la hará el paciente colectando una porción pequeña, de aproximadamente 5 gms. en recipientes limpios,secos de boca ancha, cuidando evitar cualquier contacto con orina,tierra o cualquier otra sustancia. El reci--- piente deberá taparse en forma hermética y etiquetarse con el -- nombre,sexo y edad del paciente,fecha y hora de la colecta.

CONSERVACION DE LA MUESTRA:

Cuándo se manejan heces formadas se podrán dejar a temperatura - ambiente sin exposición al sol durante 12 hrs., sin que se pierdan las caracteristicas diagnósticas de los parásitos; sin embargo, es preferible conservarlas en refrigeración hasta su entrega al laboratorio. En cambio cuándo se trata de heces líquidas o -- semi-líquidas deberán examinarse en un plazo mayor de una hora y nunca deberán refrigerarse.

Para conservar las muestras por un tiempo mayor sin correr el -- riesgo de que los parásitos en ellos contenidos se deformen,degeneren o destruyan, se podrá recurrir a sustancias preservadoras' ;o hay fórmula alguna de éstas que preserve todas las fases parasitarias (huevos, larvas,quistes,trofozoitos) ni para lograr un' material que pueda al mismo tiempo concentrarse y teñirse permanentemente.

Para lograr preservar las cuatro fases parasitarias se puede recurrir a preservadores como el merthiolato-yodo-formaldéhido --- (MIF) y al fenol-alcohol-formaldéhido (PAF). El alcohol polivinilico (PAV) permite preservar trofozoitos y quistes con la posibilidad de prepararse frotis para tinción permanentes,incluso - meses después de conservados.

Existen otros preservadores como solución de Shaudinn,solución' de formol al 5 % y 10 %, solución de glicerina al 50 %, Lacto-Fenol de Amann,etc., Para la preservación de las muestras,éstas -- soluciones se agregan en proporción de 2 a 3 volúmenes por cada' uno de materia fecal procurando lograr una homogenización completa.

TECNICAS DE ANALISIS COPROPARASITOSCOPICO

METODO DIRECTO EN FRESCO:

INTRODUCCION: Esta técnica parasitoscópica es la más antigua que se conoce; existen datos acerca de que Antony Van Leewenhoek a' mediados del siglo XVII, al observar trofozoitos de Giardia lamblia en sus propias heces fecales, haya sido el primero en utilizar un método coproparasitoscópico directo en fresco.

MATERIAL Y EQUIPO:

Aplicadores de madera o palillos
Portaobjetos
Cubreobjetos
Solucion salina isotónica
Lugol parasitológico
Microscopio compuesto

METODO:

En un portaobjetos, poner por separado en cada extremo una gota de solución salina isotónica y otra de lugol parasitológico, con el aplicador, tomar una muestra de 1 a 4 mg. de heces, en muestras' con moco y sangre elegir esa parte para estudiar; mezclar con la -- solución isotónica procurando hacer una suspensión y no un frotis,' quitar de la suspensión fibras y otros fragmentos sólidos; poner el cubreobjetos, repetir estas operaciones en la gota de lugol parasitológico; examinar al microscopio.

INDICACIONES Y LIMITACIONES:

Este método está indicado para la detección de trofozoitos de protozoarios, a partir de heces liquidas o semiformadas.

METODO DE CONCENTRACION POR CENTRIFUGACION-FLOTACION (FERREIRA)

INTRODUCCION: Ferreira y Abreu basados en el metodo de Faust - desarrollaron esta técnica, util para el recuento de larvas y hue-- vos de helmintos. En la actualidad a pesar de los buenos resultados se utiliza poco por problemas de material y equipo comercial. Este' metodo es el usado de rutina en el Hospital Infantil de Mexico.

PRINCIPIO: Este método se basa en una combinación de los principios de flotación y gravitación. El sulfato de zinc en solución de 1.192 grados Baumé de densidad, además de mayor peso que algunas formas de los parásitos no produce retracción de los quistes, larvas y los huevos flotan, fenómeno que se acelera por centrifugación y concentración del material mediante un dispositivo especial La campana de Ferreira.

MATERIAL Y EQUIPO:

Sulfato de zinc Q.P.
Yodo (cristal en polvo)
Yoduro de potasio
Formol al 10 %
Agua destilada
Tela de Alambre
Centrifuga con camisas para tubos de 25 x 100 mm
Recipiente de boca ancha
Tubos de ensaye de vidrio de 25 x 100 mm
Portaobjetos
Cubreobjetos
Campana de Ferreira
Microscopio compuesto

METODO:

Se prepara una suspensión de materia fecal, se tara un frasco de boca ancha con un abatelenguas se pesan 4 gr. de materia fecal y se le agrega 36 ml. de agua formolada al 10 % y se homogeniza; se centrifuga la suspensión a 2000 rpm. durante un minuto, se saca se decantanta el sobrenadante, se añde agua para resuspender el sedimento agitando con un aplicador y se vuelve a centrifugar, repitiendose la operación hasta obtener un sobrenadante limpio; se centrifuga la suspensión con sulfato de zinz a 1.192^{0} Baumé, se agita con el aplicador de madera hasta resuspender el sedimento y se completa el tubo con la misma solución se sulfato de zinz, se introduce en el tubo la campana cerciorándose que la solución cubra el contrapeso. Terminandose la centrifugación se saca el tubo se toma la campana

presionandose el tubo de caucho con los dedos índice y pulgar, se - invierte la campana sobre un portaobjetos agregandole de 2 a 3 go-- tas de lugal parasitológico por la parte ancha de la campana. Se -- mezcla con la orilla de un cubreobjetos y se deja caer sobre el pro ducto. Se examina la preparación sistematicamente con el objetivo - seco debil y se cuentan todos los huevos y larvas presentes.

CALCULOS

Se cuentan los huevos y larvas que se encuentren en toda el - area del cubreobjeto y se multiplica por 5, de es manera se obtendrá aproximadamente el número de huevos por gr. de heces. Los quistes y protozoarios solo se reportaran. El resultado se expresa huevos o - larvas por gramo de heces (h.g.h.).

INDICACIONES Y LIMITACIONES:

Este método es útil para el recuento y cuantificación de hue vos o larvas de helmintos pero los huevos de Ascaris no fecundados y algunos de uncinaria no los concreta y los quistes de protozoa-- rios únicamente se reportan.

METODO DE GRAHAM (RASPADO PERIANAL)

INTRODUCCION: Heller en 1876 fue el primero en recomendar el - raspado anal, para obtener material para el examen microscopio en busca de huevos de Enterobius vermicularis. Pero en 1941 Graham - introduce la técnica de la cinta de celulosa scotch, la cual lle- va su nombre. Es útil para buscar huevos de Enterobius vermicula- ris. Mazzoti la considera la técnica preferida para obtener huevos de Taenia solium. Ocasionalmente se puede encontrar huevos de Asca ris lumbricoides, Trichuris trichiura, e Hymenolepis nana.

FUNDAMENTO: La hembra adulta de Enterobius vermicularis , ha- bitualmente no deposita sus huevos en el interior del intestino, - sino por lo general emigra durante la noche hacia las margenes del ano depositando los huevos en los pliegues perianales. Es por esto que la toma debe efectuarse en la mañana y en las zonas antes men- cionadas.

MATERIAL Y EQUIPO:

Cinta celulosa transparente adhesiva de 12 mm. de ancho
Abatelenguas
Portaobjetos
Microscopio compuesto

METODO:

El paciente, se deberá presentar al laboratorio, recomendándole anteriormente que no defeque, ni se bañe antes de practicarle el estudio, ya que de lo contrario los huevos de Enterobius vermicularis serán arrastrados mecánicamente.

Se coloca al paciente en posición genupectoral exponiendo el esfínter anal y perianal. Sobre un extremo de abatelenguas se coloca la cinta en parte adherente hacia afuera sujetándola con los dedos pulgar e índice, se presiona la superficie sobre la región perianal hacia uno y otro lado, finalmente se hace un frotis perianal.

Separar cuidadosamente la cinta del abatelenguas y adherirlo sobre el portaobjeto , observarlo al microscopio compuesto con el objetivo seco débil.

INDICACIONES Y LIMITACIONES:

Util para la búsqueda de Enterobius vermicularis; sin embargo, como ya se le considera como una técnica útil para obtener huevos de Taenia solium.

BACILOS ACIDO-ALCOHOL RESISTENTES (BAAR)

INTRODUCCION: Las micobacterias forman un grupo de microorganismos aerobios que contienen lípidos y ceras en su protoplasma. La fracción cerea se cree que participa en la propiedad peculiar de éstos organismos de ser ácido resistentes debido al componente cereo, éstos microbios no pueden ser clasificados según' la tinción de Gram ya que una vez que el microbio se ha teñido - con los colorantes básicos no puede ser decolorado por el alco-- hol.

. BAAR EN LA EXPECTORACION:

Este tipo de muestra es en la que con más frecuencia solicitan investigar BAAR, ésto se debe a que la localización pulmonar es la forma más frecuente de la tuberculosis. En el país hay a-- proximadamente 500,000 enfermos de tuberculosis.

MATERIAL Y APARATOS:

Sustancias:
Acido clorhídrico q.p.
Hidróxido de sodio q.p.
Fenolftaleína q.p.
Alcohol de 96 grados
azul de metileno

Reactivos:

Hidróxido de sodio al 4 %
Acido clorhídrico al 4 %
Fenolftaleína solución alcoholica al 0.?,%
Fucsina de Ziehl-Nelsen modificada
solución de azul de metileno

Preparación de los reactivos:

Hidróxido de sodio al 4 %	Pesar 4 grs. de hidróxido de - sodio q.p. disolver y aforar a 1,000 ml.
Solución alcohólica de fenolftaleína al 0.2 %	Pesar 0.2 grs. de fenolftaleína q.p. en 100 ml. de H20 destilada.
Acido clorhídrico al 4 %	Mezclar 4 ml. de ácido clorhídrico q.p. en 100 ml. de agua ' destilada.
Alcohol-acido díluido al 3 %.	Mezclar 3 ml. de ácido clorhídrico q.p. en 100 ml. de alcohol de 96 grados.

METODO:

Muestra: Expectoración de toda la noche y la primera de la mañana en recipiente que proporciona al laboratorio.

Técnica: La investigación de Mycobacterium tuberculosis debe hacerse por tres procedimientos:

1.- Frotis directa hecho con particular seleccionadas de la expectoración.

2.- Frotis de un concentrado previamente homogenizado con el hidróxido de sodio.

3.- Cultivo.

Frotis directo: Con una asa de platino se toman las partículas caseosas o grumos de pus con ellos se hace un frotis en un portaobjeto, se deja secar, se fija con el calor y se tiñe con el método de Ziehl-Neelsen. Se esteriliza el asa en agua hirviendo o en fenol al 10 % nunca en la flama

Frotis y cultivo método de concentración. A la expectoración se le añade igual cantidad de hidróxido de sodio al 4 %, se agita durante 15 minutos y se decanta.

Al sedimento se le añade una gota de indicador de fenolftaleína, neutralizandose con ácido clorhídrico diluído al 4 %.
Con una pipeta Pasteur se siembran tres gotas en cada uno de dos medios de Löwenstein-Jensen modificado por Holm y otro con glicerina. Los tubos se dejan inclinados a la temperatura ambiente toda la noche.

Se incuban a 37 grados centigrados durante dos meses, si después de dos semanas hay desarrollo de colonias blanco amarillentas y secas, se hace un frotis que se tiñe por el método de Ziehl-Neelsen, después de sembrar los medios se hace un frotis del sedimento y se tiñe por el método de Ziehl-Neelsen.

VALORES NORMALES: Negativo.

BAAR EN LA ORINA:

MATERIAL Y APARATOS:

Igual en BAAR en la expectoración:

METODO:

Muestra: La orina debe ser de 24 hrs. de preferencia debe - tomarse en frasco estéril con tapón de rosca.

Técnica: Con movimientos rotatorios homogenizar perfectamente la muestra, centrifugar de 15 a 20 minutos a 3,000 r.p.m.' desechar el sobrenadante,homogenizar el sedimento y agregar - solución amortiguadora de fosfatos con PH de 7.2 a 7.8, cen-- trifugar desechar el sobrenadante y tomar con pipeta Pasteur' el sedimento para hacer un frotis,fijar el frotis con metanol y teñirlo por el método de Ziehl-Neelsen y observarlo al mi-- croscopio.

Con una pipeta Pasteur se siembran tres gotas en cada uno de' dos medios de Löwenstein-Jensen.

VALORES NORMALES : Negativo.

I N M U N O L O G I A:

INTRODUCCION: Uno de los principales retos a la ciencia médica moderna es la traducción de los adelantos básicoas de la inmunoquimica y la inmunobiologia en procedimientos de diagnósticos y terapéutica que serán de utilidad en la práctica de la medicina clínica. La mayor parte de este trabajo se hace en el laboratorio de inmunología.

En las últimas décadas los métodos inmonológicos de laboratorio se han vuelto cada vez más refinados y simplificados; debido a su especifidad y sensibilidad inherentes, estos métodos han alcanzado en la actualidad un papel central en la ciencia moderna del laboratorio clínico.

En el presente capitulo, son descritas las pruebas para la localización de antígenos y anticuerpos. La mayor parte de las técnicas descritas involucran la aplicacion en el laboratorio clinico de los principios de los diversos métodos inmunologicos como son:

A.- Inmunodifución: La finalidad de todas las técnicas de inmunodifución es identificar la reacción antigeno-anticuerpo por la reacción de precipitación; las determinantes más importantes de la reacción, son las concentraciones relativas de precipitación; en cualquier sistema de inmunodifución es altamente dependiente de las concentraciones relativas del antigeno y del anticuerpo, por lo tanto, la dilucion de los anticuerpos necesita reaccionar con cantidades fijas de antígeno con el fin de obtener lineas de máximas de precipitinas.

B.- Electroforesis: Es la separación de móleculas en un campo electrico. El análisis de la heterogeneidad de las proteinas individuales se lleva a cabo más facilmente por electrofóresis; las proteinas son separadas en la electroforesis de zona casi exclusivamente sobre la base de su carga eléctrica superficial. La electroforesis es metodo valioso para el diagnóstico de los trastornos con paraproteinas humanas como el mieloma multiple y la macroglobulinemia de Waldenström.

D.- Inmunoelectroforesis: La inmunoelectroforesis combina la' difución por separación electroforética y la precipitación inmunitaria de las proteinas.

b.- Inmunofluorescencia: La inmunofluorescencia es esencialmente una tecnica histoquímica o citoquímica para la identificación y localización de antígenos. El anticuerpo específico es conjugado con los compuestos fluorescentes, resultando un trazador sensible con reactividad inmunitaria inalterada. El antisuero conjugado es añadido a las células o a los tejidos y se fija' a los antigenos formando por lo tanto un complejo inmunitario' inmunitario estable. Las proteinas no anticuerpo son eliminadas' mediante el lavado y la preparación resultante es observada con un microscopio fluorescente.

E.- Aglutinación: Los eritrocitos, las bacterias, los hongos' pueden ser aglutinados directamente por los anticuerpos séricos. Las pruebas para identificar anticuerpos específicos son llevadas a cabo titulando seriadamente antisueros en diluciones al doble en presencia de una cantidad constante de antígeno.
La aglutinación indirecta (Pasiva); es la aglutinación de los' .eritrocitos u otras particulas inertes los cuales pueden ser absorbidos por una gama de antígenos solubles de manera pasiva o acoplarse quimicamente; muchos antígenos se acoplan de manera espontánea a los eritrocitos formando reactivos estables para la identificación de anticuerpos.

F.- Inhibición de la hemaglutinación: La inhibición de la aglutinación de los eritrocitos recubiertos con antígeno por el antígeno homólogo es un metodo sensible y especifico para la identificación de pequeñas cantidades de antigeno soluble en la sangre o en otros liquidos de los tejidos. El principio de este' análisis es que, el anticuerpo incubado previamente con antígenos homólogos solubles o de reaccion cruzada es inactivado cuando se incuba con eritrocitos recubiertos de antígeno.

G.- Fijación de complemento: Analisis estándar del suero usado para demostrar una reacción antigeno-anticuerpo en la cual el complemento se, fijado como resultado de la formacion de complejos inmunitarios,

A N T E S T R E P T O L I S I N A S "O"

FUNDAMENTO: Las antiestreptolisinas son anticuerpos que aparecen en las personas que padecen una infección por Streptococcus beta hemolítico. Los resultados se expresan en unidade Tood. Generalmente, se considera que las cifras de 50 unidades Todd o menos significan que no existe infeccion por Streptococcus; los resultados de 500 unidades o más son mus sugestivos de infección reciente y activa por Streptococcus. Una sola determinación no tiene valor, la prueba debe repetirse con lapsos de dos semanas. El incremento de los titulos indica actividad en la infección.

MATERIAL Y APARATOS:

Equipo para determinar estreptolisinas "O"
Amortiguador de estreptolisinas "O"
Globulos rojos al 5 %
Baño maria de 37 grados centigrados.

METODO:

Centrifuge la sangre, separe el suero y con este haga una una dilución del suero 1:50 (9.8 ml. de solución amortiguadora y 0.2 ml. del suero).
Tome 5 tubos y ponga las siguientes cantidades de solución amortiguadora:

Número de tubo	Solución amotiguadora en ml.
1	0.6
2	0.5
3	0.5
4	0.5
5	0.5

Ponga 0.1 ml. de suero diluido en el tubo y pase al siguiente tubo 0,5 ml. y continue en la misma forma hasta llegar al tubo número cinco, del que se desechan 0.5 ml.

Ponga en cada tubo 0.25 ml. de solución de estreptolisina.

Incube en baño de agua a 37° C. por 15 minutos.

Ponga en cada tubo 0.25 de globulos rojos al 5 %.

Agite suavemente e incube nuavamente a 37° C. por - 30 minutos.

Centrifuge los tubos a 1000 - 1500 r.p.m por un minuto.

LECTURA:

La dilucion del último tubo en el cual no hubo hemolisis se tomorá como el número de unidades de antiestreptolisina:

número de tubo	Unidades Todd
1	125
2	250
3	500
4	1000
5	2000

NOTA: Ponga siempre controles de globulos rojos, de estreptolisina y un suero con un titulo conocido de antiestreptolisina.

Reconstituir el frasco de estreptolisina segun las instrucciones que trae el equipo.

VALORES NORMALES:

Niños: de 0 a 50 unidades

Adultos: Hasta 200 unidades

CUADRO 8 ANTIESTREPTOLISINAS EN SUERO

Dilución del suero				Diluir al 1:50 Suero del paciente 0.2 ml Sol. amortiguadora 9.8 ml.
Tubos	1	2	3	4	5
Sol. Amortiguadora	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5
Suero diluido 1:50	0.4	0	0	0	0
	Pasar 0.5 ml. del primero al segundo, de este al tercero, etc.				
Estreptolisina "O"	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	Agitar suavamente para mezclar, e incubar a 37° C. por 15 minutos; es importante que esto sea lo más exacto posible				
Glóbulos rojos al 5%	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	Agitar suavamente e incubar a 37° C. por 15 minutos				
	Agitar suavamente e incubar a 37° C. por 30 minutos				
	Centrifugar por un minuto a 1000- 1500 r.p.m.				
Unidades	125	250	500	1000	2000
	100	166	333	833	

TITULO: El último tubo que no tenga hemólisis será la lectura.

V. D. R. L.

FUNDAMENTO:

Esta prueba se basa en la circulación visible del antígeno artificial (combinación del colesterol cubierto de lipoide con - cardiolipina) en presencia del anticuerpo del suero del paciente. Esta prueba es útil para pacientes que padecen sífilis y - otras enfermedades como mal del pinto, lepra y paludismo.

MATERIAL Y EQUIPO:

Equipo para determinar V.D.R.L.

METODO:

Colocar .05 ml. de suero inactivado y colocarlo en la -- placa de vidrio que trae el equipo.
Añadir una gota de emulsión del antígeno al suero
Rotar la placa durante cuatro minutos
Las reacciones se leen inmediatamente después de la rotación.

LECTURA:

No hay grumos o sólo ligera floculación:	NEGATIVO
Pequeños grumos:	DEBILMENTE NEGATIVO
Grupos medianos y grandes:	POSITIVO

VALORES NORMALES NEGATIVO:

Nota: Seguir las instrucciones que trae el equipo para el buen desarrollo de la técnica.

PROTEINA "C" REACTIVA

FUNDAMENTO: La proteína "C" reactiva es una globulina alfaanormal: su nombre proviene de que puede formar un precipitado con el polisacárido somático "C" del nuemococcus. La proteína "C" reactiva se valora por reacciones de precipitación, usando como reactivo suero antiproteína "C" reactiva. Esta proteína, que se encuentra en personas que sufren de infecciones (distintas de la neumonía) y entrasntornos inflamatorios no infecciosos, ha dado origen a una prueba capilar y a una prueba rápida de aglutinación en placa, que son muy útiles para el diagnóstico y el pronóstico de la fiebre reumática y otras enfermedades inflamatorias. La proteína no se encuentra en sujetos normales y desaperece cuándo cura el enfermo.

MATERIAL Y EQUIPO:

Equipo comercial para proteína "C" reactiva.

METODO:

El equipo comercial es una prueba de aglutinación en placa se coloca una gota del suero del paciente y otra gota del reactivo de latéx antiproteína "C" reactiva. Es positiva cuándo nuestra aglutinación a simple vista. Cuándo es positiva es necesario el estudio cuantitativo. En este caso se preparan diluciones seriadas del sucro problema y se añade a cada dilución de suero sobre la placa una gota de reactivo de látex antiproteína "C" reactiva. La mayor dilución del suero que muestra aglutinación a simple vista se acepta como el título de proteína "C" reactiva del suero problema.

VALORES NORMALES: NEGATIVO

Nota: Seguir las instrucciones que trae el equipo para el buen desarrollo de la técnica.

REACCIONES FEBRILES:

FUNDAMENTO: estas reacciones se basan en el hecho de que - cuándo el organismo humano es invadido por agentes infecciosos' responden produciendo anticuerpos aglutinantes contra ellos,los cuáles se ponen de manifiesto al entrar en contacto el anticuerpo con el antígeno específico.

Para la detección de los antígenos se usan el suero del enfermo y antígeno purificados. El título depende del tipo y curso de la enfermedad.

AGLUTINACION EN PLACA:

MATERIAL Y EQUIPO:

Antígenos febriles equipo comercial
Placa de vidrio
Pipetas graduadas
Aplicadores

METODOS:

1.- En la placa de vidrio se ponen o.04 ml. del suero para cada uno de los antígenos que se vayan a usar.

2.- A cada 0.04 ml. de suero añadir una gota de cada antígeno.

3.- Mezclar con aplicador diferente para antígeno.

4.- Colocar la placa en el vibrador durante 2 mins.

5.- Observar la aglutinación cuándo hay reacción positiva

6.- Se repite la técnica descrita con diluciones del suero, en la forma siguiente:

Mililitros de suero	Dilución
0.08	1:20
0.04	1:40
0.02	1:80
0.01	1:160
0.005	1:320

El informe sehace tomando en consideración la dilución más alta en la que se observe reacción positiva.

NOTA: Seguir las instrucciones de manejo de los antígenos según la técnica que trae el equipo para el buen desarrollo de ésta.

AGLUTINACION EN TUBO:

Esta aglutinación es más segura que la de aglutinación en placa

MATERIAL Y APARATOS:

Tubos de vidrio
Equipo de antígenos de la S.S.A.
Baño de agua
Pipetas graduadas
Solución salina
Fenol
Formol

METODO:

El antígeno es concentrado es necesario diluir 1:100 con solución salina con formol y al antigeno de brucela se le pone fenol como preservativo.

Hacer diluciones del suero problema como aparece en el cuadro 8. -- Leer la aglutinación y anotar la dilución máxima del suero en la - cual se observa aglutinación.

CUADRO 9 AGLUTINACION EN TUBO

Núm. de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol. salina ml.	0.8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Suero en ml.	0.2 ml pasar 0.5 del primero al segundo, de este al tercero, etc. y descartar 0.5 ml del decimo. en cada pasar mezclar.									
Dilucion inicial	1/5	1/10	1/20	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	control	
Agregar 0.5 ml. de antigeno a todos los tubos										
Dilucion final	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1260	1/2560	

NOTA: Reconstituir los antígenos según las instrucciones que trae el equipo, ya que éstos están concentrados.

COMPLEMENTO HEMOLITICO 50 %

FUNDAMENTO: La hemólisis de los eritrocitos mediada por anticuerpos específicos en presencia dela secuencia intacta del complemento puede ser empleada como una prueba cruda escrutadora de la actividaddel complemento en el suero humano. De manera clásica, la prueba de hemólisis emplea eritrocitos de carnero, anticuerpo de conejo para los eritrocitos de carnero y el suero fresco de cobayo como fuente complemento. La hemólisis se mide espectrofotometricamente como la absorbancia de la hemoglobina liberada y puede relacionarse de manera directa con el número de eritrocitos lisados. La cantidad de lisis en un sistema describe una curva sigmoide cuándo los valores son graficados contra la cantidad creciente de complemento hemolítico añadido.

La curva tiene forma de "S", pero en la región intermedia,cerca de 50 % de hemólisis,existe una relación casi lineal entre el grado de hemólisis y la cantidad de complemento presente. En ésta gama el grado de eritrocitos lisados es muy sensible a cualquier alteración en la concentración decomplemento. Para fines clínicos, la medición de la actividad hemolítica total delsuero es tomada en el nivel de 50 % de hemólisis.

MATERIAL Y EQUIPO:

Solución de TBS
Glóbulos rojos de carnero (GRC) 2 % sensibilizados
Suero del paciente
Tubos de ensaye
Hemólisina 1:6000
Espectrofotómetro

METODO:

Preparación de GRC 2%
Lavar los eritrocitos con solución TBS
Volumén de 1:1 de eritrocitos más hemolisina, se obtienen los eritrocitos sensibilizados 37 grados centigrados 30 minutos.
Calcular la cantidad de eritrocitos y de solución de TBS para obtener GRC 2 % sensibilizados,según el número de pruebas. Ya calculadas las cantidades éstos deben dar una absorvancia de 0.5 para que sea un 2 %. Para esto se monta un blanco y un problema como sigue:

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

BLANCO	PROBLEMA
2 ml H_2O	0.7 H_2O
	0.3 Ml. GRC 2%

Leer a 550 nm absorbancia esperada 0.5 sino da 0.5 por ejemplo que de 0.57 se calcula la cantidad que le falte de solución de TBS. Cúando es mayor la absorbancia, por ejemplo, si necesitamos 40 ml. de GRC, tendríamos que mezclar 19.6 TBS más 0.4 ml de GRC y si nos da la absorbancia 0.57 el cálculo sería el siguiente:

0.5 es a 20
0.57 es a X, X-22.8 por lo tanto tendríamos queagregar
2.8 ml. de TBS.

Hacer diluciones como aparece en el cuadro 10

CUADRO 10 COMPLEMENTO HEMOLITICO 50 %

Núm. de tubo	1	2	3
Sol. de TBS en ml.	4.2	1	2
Suero en ml.	al tubo 1 ponerle o.2 rl. y de éste - tubo pasar 1 ml. al tubo 2 y de éste 1 ml al tubo 3.		
Título obtenido	1:25	1:50	1:75

De las diluciones obtenidas anteriormente se hacen diluciones según el cuadro 11.

CUADRO 11 COMPLEMENTO HEMOLITICO 50 %

	TITULO 1:25				TITULO 1:50				TITULO 1:75			
Núm de tubo	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Díl. en ml.	.15	.25	.35	.5	.15	.25	.35	.5	.15	.25	.35	.5
TBS en ml.	.75	.65	.55	.4	.75	.65	.55	.4	.75	.65	.55	.4
GRC 2 %	0.6 ml. a todos los tubos											

	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
H_2O en ml.	0.9	----
TBS EN ml.	----	0.9
GRC 2 % en ml.	0.6	0.6

INCUBAR POR 30 MINUTOS A 37° C.

CENTRIFUGAR A 1500 r.p.m. por 4 MINUTOS

LEER ESPECTROFOTOMETRO a 550 nm.

CALCULOS:

Lectura control positivo= x

Lectura control negativo= 0

La lectura de cada dilución se pasa a porcentaje.

Ejemplo:

Lectura control positivo sea igual a 0.37

Lectura de una de las diluciones igual a 0.365

0.37 es a 100 %

0.365 es a X

X = 98.64.

Ya que se tienen todos los porcentajes se grafican escogiendose la dilución mas cercana al 50 %

Ejemplo:

La dilucion mas cercana al 50% fue la equivalente a.26 ml segun la grafica. para determinar las unidades hemoli-- ticas se realizan los siguientes calculos.

.26 ml es a 1 UH

1 ml es a X

X= 3.8 UH

1 ml. es a 3.8 UH

50 ml. es a X

X = 190 UH

VALORES NORMALES: 150 a 250 UH.

IV .- RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Esta proposición de manual se ha realizado con el fin de que sirva de guía a todos aquellos estudiantes relacionados con el area médica bacteriológica y muy especialmente a los estudiantes de la carrera de Químico Farmaceuticobiólogo y de ponerlos en contacto con una serie de métodos directos para dar brevedad en el aislamiento e identificación de las especies más comunes que producen patología humana.

Esta brevedad podemos encontrarla a partir de la consulta de los cuadros de marcha que en cada uno de los métodos descritos se presentan. Si por ejemplo; quisieramos estudiar la presencia de salmonelosis en una población determinada. solo tendría el consultante, que acudir al cuadro # 1 referido a coprocultivo y observar y poner en práctica los pasos que en ese se mencionan.

Durante el desarrollo de la investigación de la presente tesis, se observa como los métodos clínicos bacteriológicos muestran el máximo porcentaje de confiabilidad, en virtud de que dichos métodos son del uso común y constante en los hospitales pediátricos y principalmente en el Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez, lugar en el cual se realizó el presente estudio durante un periodo de seis meses, tiempo en el cual se pudo observar una positividad acertada de acuerdo al número de pacientes que se les realizaba los diferentes estudios bacteriológicos.

Se añade a este estudio una serie de pruebas que son auxiliares de la bacteriología, las cuales tienen un máximo de confiabilidad, que aunque son de uso comercial, los resultados que ellas arrojan tienen un 100 por ciento de certeza. Información que manejada como guía o manual, al estudiante le enseña el camino para determinar en forma inmediata la presencia de anticuerpos en cualquier organismo y que sean producidos por el aparato inmunitario.

Los resultados satisfactorios en cualquier método que se siga de los mencionados en este manual, dependerá de la experiencia que se haya obtenido en el ramo de la bacteriología.

BIBLIOGRAFIA:

1.- Becton Dickinson de México, S.A. de C.V. Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos BBL - México, 1974. Editado por Pald A. Rohde B.A.

2.- Cowan y Steel's Manual para la identificación de - bacterias de importancia médica. México, 1979. Editorial CECSA.

3.- Manual de Laboratorio curso de bacteriología anaerobia. Guadalajara, Jalisco, 1982. Educación continuada U.A.G.

4.- H. Hunch Funderberg, Stites, Caldwell, Wells. Manual de Inmunología Clínica. México, 1980. Editorial Manual Moderno.

5.- I.M.S.S. Laboratorio Clínico Procedimientos. México, 1978

6.- Koneman, Allen, Dowell, Sommers. Diagnostico Microbiológico. México, 1984. Editorial Médica Panamericana.

7.- Lynch Raphael, Melccor, Saare, Inwood, Métodos de Laboratorio. México, 1972. Editorial Interamericana.

8.- Mac Faddin, Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Médica. México, - 1984. Editorial Médica Panamericana.

9.- Alvarez, C.R. y Cols. Manual de Técnicas. Laboratorio de Parasitología. México, D.F. Hospital del Niño DIF.